

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno - matematički fakultet  
Biološki odsjek

Sven Horvatić

Produkcija zvukova ponto-kaspijskog riječnog glavočića (*Neogobius fluviatilis* (Pallas, 1814)) i njegova srodnost s mediteranskim vrstama s obzirom na akustična svojstva

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad izrađen je u laboratoriju za Okolišne znanosti, Informatiku i Statistiku, Sveučilišta Ca' Foscari', u Veneciji (Italija), u sklopu ERASMUS stručne prakse, pod vodstvom prof. dr.sc. Stefana Malavasija i izv. prof. dr. sc. Davora Zanelle. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

## **ZAHVALE**

Srdačno se zahvaljujem prof. dr. sc. Davoru Zanelli na pruženoj prilici tijekom istraživanja, ali i na iskazanom povjerenju tijekom čitavog studiranja.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Stefanu Malavasiju što me uveo u svijet bioakustike, dr. sc. Francescu Cavararu, na pomoći prilikom eksperimentalnog dijela istraživanja te doc. dr. sc. Marku Miliši na pomoći sa statističkim dijelom rada.

Zahvaljujem se Agenciji za mobilnost i programe EU (ERASMUS) što su mi omogućili studiranje u inozemstvu.

Veliko hvala svim mojim prijateljima koji su uvijek tu uz mene, u dobrim i lošim vremenima.

I najveće hvala mojoj obitelji i djevojci, koji su pokazali toliko strpljenja, ljubavi i poštovanja pema meni tijekom cijelog mog studiranja, ali i života. Hvala vam što ste mi dali dobru podlogu za ostatak života.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## **Produkcija zvukova ponto-kaspijskog riječnog glavočića (*Neogobius fluviatilis* (Pallas, 1814)) i njegova srodnost s mediteranskim vrstama s obzirom na akustična svojstva**

Sven Horvatić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cilj provedenog istraživanja bio je opisati vokalni repertoar ponto-kaspijskog riječnog glavočića (*Neogobius fluviatilis*) te usporediti njegova akustična svojstva s vokalnim mediteranskim vrstama iz *Gobius* grupe. Produkcija zvuka bila je inducirana “testom uljeza”. Istražili smo 5 akustičnih svojstva za 13 jedinki. Vokalni repertoar riječnog glavočića sastoji se od niza kratkih zvukova produciranih tijekom agresivnih i reproduktivnih interakcija. Zvukovi se sastoje od rapidno ponovljenih pulseva, tipičnog tonalnog karaktera. Zvukovi traju oko 200 ms uz prosječnu vrijednost frekvencije od oko 80 Hz. Struktura zvuka se nije mijenjala s obzirom na etološki kontekst, što potvrđuje njen stereotipski karakter. Podaci o akustičnim svojstvima riječnog glavočića zajedno sa podacima mediteranskih vrsta, analizirani su pomoću Faktorijalne diskriminantne funkcijske analize (DFA) kako bi procijenili u kojoj se mjeri vrste mogu razlikovati s obzirom na njihova akustična svojstva. Rezultati pokazuju kako je stopa ponavljanja pulseva najvažnije svojstvo za razlikovanje vrsta. Smatramo kako upravo ta karakteristika zvuka sadrži informacije o samoj vrsti zbog čega je ključna pri određivanju filogenetskih odnosa. Naše istraživanje pokazuje, sukladno molekularnim filogenetskim analizama, da se vrste koje produciraju tonalne zvukove grupiraju zajedno. Rezultati provedenog istraživanja interpretirani su sukladno geološkim i filogenetskim događajima za koje se vjeruje da su potaknuli specijaciju europskih glavoča.

(23 stranice, 8 slika, 3 tablice, 90 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: glavoči, akustična svojstva, Mesinska kriza saliniteta

Voditelj: Izv. prof. dr. sc. Davor Zanella

Ocjenitelji: Dr. sc. Davor Zanella, izv. prof.

Dr. sc. Zrinka Ljubešić, doc.

Dr. sc. Duje Lisičić, doc.

Rad prihvaćen: 15. rujna 2015.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation thesis

### **Sound production in the Ponto-Caspian goby (*Neogobius fluviatilis* (Pallas, 1814)) and its acoustic affinity with mediterranean species**

Sven Horvatić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The aim of this study was to describe the vocal repertoire of the Ponto-Caspian goby (*Neogobius fluviatilis*) and to compare its acoustic properties with those of the other soniferous Mediterranean gobies belonging to the “Gobius” lineage. Sound emission was elicited by means of “intruder tests”. 5 acoustic properties were measured from 13 individuals. The vocal repertoire of the species consisted of sequences of short vocalizations (average 200 ms) showing an average fundamental frequency of about 80 Hz during both agonistic and reproductive intraspecific interactions. Sound properties did not differ between reproductive and the aggressive contexts, and the general structure of sounds were highly stereotyped. Discriminant Function Analysis was performed with individual means of five acoustic properties for seven species to assess how well species could be differentiated on the basis of acoustics, and their degree of affinities. The results suggested that the pulse repetition rate of the sounds was the most important property in differentiating the species. The species producing tonal sounds clustered together in line with the results of recent molecular phylogenetic studies. The results were discussed in light of the geological and phylogeographic events believed to have driven the diversification of European gobies.

(23 pages, 8 figures, 3 tables, 90 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: gobies, acoustic properties, Messinian salinity crisis

Supervisor: Dr. Davor Zanella, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Davor Zanella, Assoc. Prof.  
Dr. Zrinka Ljubešić, Assis. Prof.  
Dr. Duje Lisičić, Assis. Prof.

Thesis accepted: 15. September 2015.

## SAŽETAK

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. OPĆE KARAKTERISTIKE DANAŠNJIH RIBA.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1. RAZRED ACTINOPTERYGII (ZRAKOPERKE) .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2. RED PERCIFORMES (GRGEČKE).....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3. PORODICA GOBIIDAE (GLAVOČI).....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.4. ROD <i>NEOGOBIOUS</i> .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.5. <i>NEOGOBIOUS FLUVIATILIS</i> (RIJEČNI GLAVOČIĆ).....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.6. GEOLOŠKA POVIJEST SREDOZEMNOG MORA .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2. UVOD U BIOAKUSTIKU .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>12</b>
<b>2. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. UZORKOVANJE I SMJEŠTAJ RIBA.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. SNIMANJE ZVUKOVA .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3. OBRADA AKUSTIČNIH SIGNALA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.4. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA .....</b>	<b>15</b>
<b>3. REZULTATI.....</b>	<b>16</b>
<b>4. RASPRAVA.....</b>	<b>21</b>
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>23</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>24</b>
<b>7. ŽIVOTOPIS</b>	

## 1. UVOD

Ribe su najbrojnija, a ujedno i najslabije istražena skupina kralježnjaka koja danas obitava na Zemlji. Zbog osjetljivosti vodenih ekosustava te uslijed velikog antropogenog pritiska na njihova staništa smatra se kako su ribe, bez obzira na svoju brojnost, najugroženija skupina kralježnjaka (Maitland 2000).

Akustična komunikacija u životinjskom carstvu detaljno se počela istraživati posljednjih pedeset godina 20. st., te se takav trend nastavio i u 21. st., prvenstveno zahvaljujući razvoju tehnologije i znanosti. Zvukovi su neophodno komunikacijsko sredstvo u životinjskom svijetu pošto omogućuju inter- i intraspecijsku komunikaciju, čime pospješuju kompeticiju i daju jedinkama reproduktivnu prednost (Miller 2004, Malavasi i sur. 2008).

Filogenetska stabla različitih grupa životinja (kukci, žabe, ptice, sisavci) rekonstruirana na temelju akustičnih signala podudaraju se sa stablima utemeljenim na morfološkim i molekularnim podacima, čime se potvrđuje važnost zvukova u filogenetskim analizama (Oates i Trocco 1983, Cocroft i Ryan 1995, McCracken i Sheldon 1997, Conner 1999). Ribe produciraju zvukove tijekom reproduktivne sezone, za vrijeme hranjenja, ali i u drugim raznim situacijama radi međusobne komunikacije te su zvukovi vrlo važan dio njihova ponašanja (Fine i sur. 1977b), što ih čini savršenim modelnim organizmima koji se mogu koristiti u brojnim istraživanjima i eksperimentima. Metodom "pasivne akustike" znanstvenici identificiraju, snimaju i istražuju ponašanje riba, ali i ostalih podvodnih organizama. Među brojnim vokalnim vrstama riba, glavoči (porodica Gobiidae) su jedna od danas najistraživanijih grupa, unutar koje se agresivni i reproduktivni zvukovi produciraju od strane mužjaka i ponekad ženki (Torricelli i sur. 1990, Lugli i sur. 1997, Lugli i Torricelli 1999, Malavasi i sur. 2003, Myrberg i Lugli 2006, Amorim i Neves 2007). Glavoči su ujedno i jedna od najbrojnijih porodica modernih koštunjača, čiji predstavnici naseljavaju morska, slatkovodna i bočata vodena staništa u umjerenom i tropskom pojasu (Hoese 1984, Miller 1986).

Mediterransko područje naseljava otprilike 60 vrsta glavoča (Thacker i Roje 2011). Navedeni znanstvenici su temeljem molekularnih analiza ustanovili postojanje dviju grupa, od kojih jedna naseljava istočni Atlantski ocean i područje Mediterana, te je sestrinska drugoj grupi glavoča koja naseljava Crno i Azovsko more te Kaspijsko i Aralsko jezero (tzv. ponto-kaspijski glavoči). Istraživanjem varijabilnosti gena citokroma *b* (Medvedev i sur. 2013) također je potvrđeno postojanje dvaju kladusa, koji se sastoje od gore navedenih vrsta. Iako je produkcija zvukova zabilježena za otprilike 20 vrsta glavoča, podaci za zanimljivu grupu ponto-kaspijskih glavoča nedostaju te su od neprocjenjive važnosti.

Riječni glavočić (*Neogobius fluviatilis* (Pallas, 1814)) naseljava slatkovodna i bočata staništa ponto-kaspijskog zaljeva, gdje je jedna od najbrojnijih vrsta glavoča (Miller 2004). U zadnjih dvadesetak godina, vrsta migrira uzvodno rijekama i potocima prema sjeveru Europe, gdje je zabilježena daleko izvan svojega areala, što potvrđuje nalazak jedinki u rijeci Visli (Poljska). Podaci o akustičnim karakteristikama riječnog glavočića nedostaju, prvenstveno zato što nikada do sada zvukovi za navedenu vrstu nisu snimljeni u eksperimentalnim uvjetima.

Stoga, glavni je cilj diplomskog rada bio snimiti zvukove riječnog glavočića u eksperimentalnim uvjetima te istražiti njegovu filogenetsku srodnost s mediteranskim glavočima koristeći akustične podatke i bazirajući se na postojeće molekularne analize.

**CARSTVO** Animalia (Životinje)

**PODCARSTVO** Eumetazoa

**KOLJENO** Chordata (Svitkovci)

**PODKOLJENO** Vertebrata (Kralježnjaci)

**MEĐUKOLJENO** Gnathostomata (Čeljustouste)

**RAZRED** Actinopterygii (Zrakoperke)

**PODRAZRED** Neopterygii (Novozrakoperke)

**NADRED** Teleostei (Prave kostunjače)

**RED** Perciformes (Grgečke)

**PODRED** Gobioidi

**PORODICA** Gobiidae (Glavoči)

**ROD** *Neogobius*

**VRSTA** *Neogobius fluviatilis* (Riječni glavočić)

Taksonomski položaj riječnog glavočića prilagođen prema Kottelat i Freyhof (2007).

## 1.1. OPĆE KARAKTERISTIKE DANAŠNJIH RIBA

### 1.1.1. RAZRED ACTINOPTERYGII (ZRAKOPERKE)

Zrakoperke (grč. *actino* = zraka, *ptero* = krilo ili peraja), zajedno s mesoperkama (Sarcopterygii), se u užem smislu smatraju ribama, te se prema starijoj literaturi klasificiraju kao jedan od podrazreda unutar koštunjača (Osteichthyes). Zrakoperke i mesoperke su kasnije podignute na višu taksonomsku razinu te se smatraju zasebnim razredima (Nelson 2006). Do danas je zadržana navedena taksonomska podjela, te se zrakoperke i mesoperke smatraju formalnim skupinama, odnosno razredima, dok se ribe, odnosno koštunjače smatraju neformalnim skupinama. Širom svijeta opisano je oko 27 000 vrsta zrakoperki, što ih čini najbrojnijim razredom kralježnjaka na svijetu, uzimajući u obzir da se godišnje opiše otprilike 150 do sada nepoznatih vrsta. Cjeloviti fosilizirani kosturi izumrlih zrakoperki datiraju još iz razdoblja srednjeg i kasnog Devona, geološkog perioda koji je završio prije otprilike 350 milijuna godina. Od tada, zahvaljujući intenzivnoj evoluciji te adaptivnoj radijaciji, naselile su slatke i slane ekosustave. U početku su zrakoperke bile male ribe (od 5 do 25 cm dužine) s jednom dorzalnom perajom te heterocerkalnom, račvastom repnom perajom. Parne peraje bile su prisutne, iako su postojale vrste koje su u svojim prsnim perajama imale razvijen mišićni sustav. Krajem Paleozoika, zrakoperke se počinju morfološki mijenjati, što se najviše može uočiti u razvoju sustava za pokretanje i hranjenje. Gornji i donji



režnjevi repne peraje postaju simetrični, te se koštane perajne šipčice počinju razvijati unutar peraja, tako da je svaka peraja bila poduprta s nekoliko njih. Navedene promjene dovele su do veće fleksibilnosti samih peraja, što im je olakšalo kretanje kroz vodeni medij. Pokrovni štit paleozojskih zrakoperki također se reducirao, što je zajedno sa pokretnim perajama, uvelike doprinijelo većoj pokretljivosti i fleksibilnosti, ali i izbjegavanju predatora. Također, gubitkom pokrovnog štita, zrakoperke su postale znatno lakše, što je vjerojatno potaknulo evolucijski razvoj plivaćeg mjehura, glavnog hidrostatskog organa (Pough 2005).

Zrakoperke su važna komponenta cjelokupne bioraznolikosti našega svijeta. Današnje zrakoperke se dijele na štitonoše (Chondrostei) koje broje oko 35 vrsta i predstavljaju neke od najranijih oblika prvobitnih koštunjača te novozrakoperke (Neopterygii), moderne zrakoperke, unutar koje prave koštunjače (Teleostei) obuhvaćaju većinu današnjih koštunjača, najraznolikijih oblika i veličina. Razvoj i modifikacije usnog aparata u kombinaciji s najrazličitijim tjelesnim oblicima omogućili su pravim koštunjačama visok stupanj specijalizacije za hranjenje i plivanje u svojem staništu. Prave koštunjače u današnje vrijeme zauzimaju gotovo svaku slobodnu ekološku nišu u vodenim staništima, dok neke vrste povremeno naseljavaju i kopnena staništa izložena dnevnim promjenama u vodenoj razini (Pough 2005).

### 1.1.2. RED PERCIFORMES (GRGEČKE)

Grgečke (grč. *perka* = grgeč, lat. *forma* = oblik ili forma) su najraznolikiji i najbrojniji red zrakoperki, što ih ujedno čini i najbrojnijim redom kralježnjaka na svijetu. Dominiraju u oceanima širom našega planeta, te su dominantna skupina riba u slatkovodnim ekosustavima umjerenih i tropskih pojasa na Zemlji. Johnson i Patterson (1993) i Nelson (1994) istaknuli su kako je red grgečki monofiletskog podrijetla jedino ako se u grupu uključe recentni predstavnici redova škarpina (Scorpaeniformes), plosnatica (Pleuronectiformes) i četverozupki (Tetraodontiformes). Istaknuli su kako bi navedena tri zadnja reda mogli predstavljati odvedenije redove u odnosu na grgečke, ali također Springer i Johnson (2004) navode da je red četverozupki stariji od samog reda grgečki (Nelson 2006).

Red grgečki obuhvaća oko 20 podredova, 160 porodica, 1 539 rodova i oko 10 033 recentnih vrsta. Osam najbrojnijih porodica (Gobiidae, Cichlidae, Serranidae, Labridae, Blenniidae, Pomacentridae, Apogonidae i Sciaenidae) sa skoro 5 479 opisanih vrsta, sačinjava oko 55 % recentnih grgečki. Većina vrsta obitava u plitkim obalnim područjima i oceanskim dubinama, dok otprilike 2 040 vrsta naseljava slatkovodna ekosustave. Grgečke se međusobno uvelike razlikuju s obzirom na veličinu tijela, te su zabilježene ujedno i najmanje vrste (*Pandaka pygmaea*), ali i neke od najvećih riba na svijetu (plavi merlin (*Makaira indica*), iglun (*Xiphias gladius*), plavoperajna tuna (*Thunnus thynnus*)). S obzirom da su rasprostranjene širom svijeta, grgečke se smatraju iznimno uspješnom i prilagodljivom skupinom riba, koja naseljava najraznolikija staništa, od koraljnih grebena u tropskom pojasu, ledenih mora u blizini Antarkike, do slatkovodnih ekosustava u Sjevernoj i Južnoj Americi, Europi i Africi (Nelson 2006).

Razvojem ljudskoga roda, rijeke i oceani pružali su im mnoge izvore hrane, među kojima je prednjačila riba. Ribolov se smatra jednim od najstarijih zanata, kojim se osiguravala hrana. Arheološki nalazi diljem svijeta (Škotska, Japan, dolina rijeke Nila, itd..) ukazuju kako je upravo riba predstavljala najvažniju komponentu ljudske ishrane kroz povijest, osiguravajući im visoko-proteinsku hranu. Također, grgečke predstavljaju jednu od najvažnijih skupina riba koja se koristi u rekreativnom i sportskom ribolovu, ali i u sklopu akvakulture, te samim time pruža ljudima brojne koristi (Nelson 2006).

Morfološki se grgečke razlikuju od ostalih skupina po svojim specifičnim karakteristikama. Tijelo im je vretenastog oblika, prilagođeno za brze i rapidne pokrete, te je pokriveno hrapavim, na kraju nazubljenim ljuskama (ktenoidne ljuske). Prsne, leđne i podrepne peraje odlikuju se nazubljenom šipčicom (bodljama), koja ih štiti od napada predatora, te pet mekih rasperjanih šipčica. Također, na škržnom poklopcu postoje nazupčane bodlje. Od dviju leđnih, prednja peraja je s tvrdim i ostrim šipčicama, a stražnja s mekim šipčicama, dok se masna (adipozna) peraja ne razvija niti u jednom dijelu života. Trbušne peraje su smještene ispod samih prsnih, dok im repna peraja ne sadrži više od sedamnaest mekih šipčica. Grgečke su bezzrakovodnice (Physoclista) pošto nemaju zrakovod spojen s jednjakom, što ih odvaja od ostalih riba koje imaju zrakovod (Nelson 2006).

### 1.1.3. PORODICA GOBIIDAE (GLAVOČI)

Porodica glavoča jedna je od najbrojnijih porodica zrakoperki, što ih ujedno čini i jednom od najbrojnijih porodica kraljeznjaka. Porodica obuhvaća oko 2000, većinom morskih, vrsta rasprostranjenih diljem svijeta, a pogotovo brojnih u tropskim obalnim područjima. Glavoči su rasprostranjeni u morskim i bočatim vodenim ekosustavima, dok ih se nekolicina može pronaći i u slatkovodnim staništima. Većina slatkovodnih vrsta rasprostranjena je diljem Sredozemlja te Ponto-kaspijskog zaljeva. Većinom su to izrazito male bentičke ribe (npr. *Economidichthys trichonis* s 25 mm jedan je od najmanjih kraljeznjaka uopće), kratkog životnog vijeka. Ono što morfološki odvaja glavoče od ostalih porodica su trbušne peraje spojene u tzv. „trbušni disk“, odnosno prijanjaljku pomoću koje jedinke stvaraju podtlak za održavanje u stupcu vode. Disk na svojem anteriornom dijelu ima razvijenu poprečnu membranu, što nekada može biti važno svojstvo prilikom determinacije vrsta. Također, leđna peraja je dvodijelna te se sastoji od dvije peraje, dok je trbušni disk (preobražene trbušne peraje) smješten neposredno uz baze prsnih peraja, odnosno nalazi se torakalno u odnosu na njih. Taksonomski status porodice glavoča kao i vrsta unutar nje, prilično je kompliciran te u budućnosti preostaje mnogo posla u smislu njegova rješavanja. Rod *Neogobius* podijeljen je na nekoliko grupa zbog svojega odnosa s ostalim Ponto-kaspijskim vrstama (*Proterorhinus* i *Mesogobius*). Molekularnim analizama potvrđeno je kako neki rodovi (*Padogobius*, *Knipowitschia* i *Pomatoschistus*), nisu u bliskoj srodnosti s obzirom na ostale rodove unutar porodice glavoča (Miller 2004).

Nekoliko vrsta Ponto-kaspijskih glavoča, autohtonih za Crno more i Kaspijsko jezero, u zadnjih dvadeset godina proširili su svoj teritorij, odnosno areal rasprostranjenosti, ukazujući na izrazito migratorni karakter. Kod nekih vrsta (*Proterorhinus semilunaris*), navedeno širenje rezultat je aktivne uzvodne migracije rijekama i potocima, dok je kod drugih vrsta (*Neogobius fluviatilis*, *N. melanostomus*, *N. kessleri*, *N. gymnotrahelus*) širenje areala posljedica slučajne pasivne introdukcije balastnim vodama, prilikom koje se jaja ili ličinke prenesu brodovima izvan autohtonog areala same vrste. Jedinke *N. melanostomus* i *N. gymnotrahelus* pronađeni su u Austriji, dok je *N. kessleri* pronađen uzvodno u gornjem toku rijeke Dunav, u Njemačkoj. Iako je naveden primjer slučajne invazije prisutan već stoljećima, utjecaj Ponto-kaspijskih glavoča pojačao se u zadnjih dvadeset godina, što može potvrditi činjenicu kako je antropogeni utjecaj (brane, hidroakumulacije, onečišćenje rijeka, kanalizacija) izrazito zaslužan za to (Miller 2003, 2004). Ponto-kaspijski glavoči *Neogobius melanostomus* i *Proterorhinus semilunaris* dospjeli su čak do Velikih jezera u Americi balastnim vodama te tamo štete sveukupnoj bioraznolikosti (Thacker i Roje 2011).

Osnovno determinacijsko svojstvo za razlikovanje rodova i vrsta glavoča je raspored i smještaj kanala, pora i senzornih papila bočne pruge na glavi, koji pružaju važne i korisne informacije. Navedena svojstva mogu biti uočena prilikom mikroskopske disekcije glave, uz korištenje kosog prigušenog osvjetljenja. Ponekad, kanali i papile mogu biti prekriveni sluzi, stoga neki znanstvenici koriste kromatske boje, željezove spojeve, ili kalijev permanganat radi boljšeg zapažanja, što na kraju dovodi do propadanja tkivnog materijala. Neovisno o kojoj metodi se radilo, identifikacija vrsta glavoča i dalje ostaje teška, čak i ponajboljim stručnjacima (Sanzo 1911, Miller u Whitehead i sur. 1986).

#### **1.1.4. ROD *NEOGOBIOUS***

##### **1.1.4.1. Srodstveni odnosi s mediteranskim glavočima**

Riječni glavočić (*Neogobius fluviatilis* (Pallas, 1814)) (Slika 1) pripada grupi tzv. "poprečnih" glavoča, s obzirom na raspored infraorbitalnih glavenih kanala i senzornih papilla, koji su karakteristično poredani kod ove grupe glavoča. Navedena grupa obuhvaća vrste iz pojedinih rodova, kao npr. mediteranski eurihalinski rod *Zosterisessor*, isključivo slatkovodni rod *Padogobius* čije su vrste rasprostranjene u Mediteranu, te dvije Ponto-kaspijske grupe *Mesogobius*, *Neogobius*, *Proterorhinus*, *Chasara* i tzv. "glavoče-punoglavce" (Miller 2004).

Miller (1986) napominje kako, s obzirom na položaj slobodnih neuromastnih organa (senzornih papilla) na glavi, ali i broj kralježaka, Ponto-kaspijski glavočići (*Neogobius*) dijele određene sličnosti sa Atlantsko-mediteranskim rodом *Gobius*. Navedeni rodovi zajedno s rodом *Zosterisessor* dijele jednak raspored infraorbitalnih papilla na glavi, dok su rod *Neogobius* i *Padogobius*, sinapomorfni s obzirom na veliki broj kralježaka (32-36) u odnosu na druge vrste, koje obično posjeduju 28 kralježaka (Simonović i sur. 1996). Također, zanimljivo je napomenuti te je od važnog evolucijskog interesa, činjenica kako rod *Zosterisessor* (predstavljen samo s jednom vrstom, *Z. ophiocephalus*) posjeduje plivači mjehur tijekom cijeloga života, dok vrste iz rodova *Neogobius*, *Padogobius*, *Proterorhinus* i *Mesogobius* ne posjeduju plivači mjehur niti u jednom stadiju života (Miller 2004).

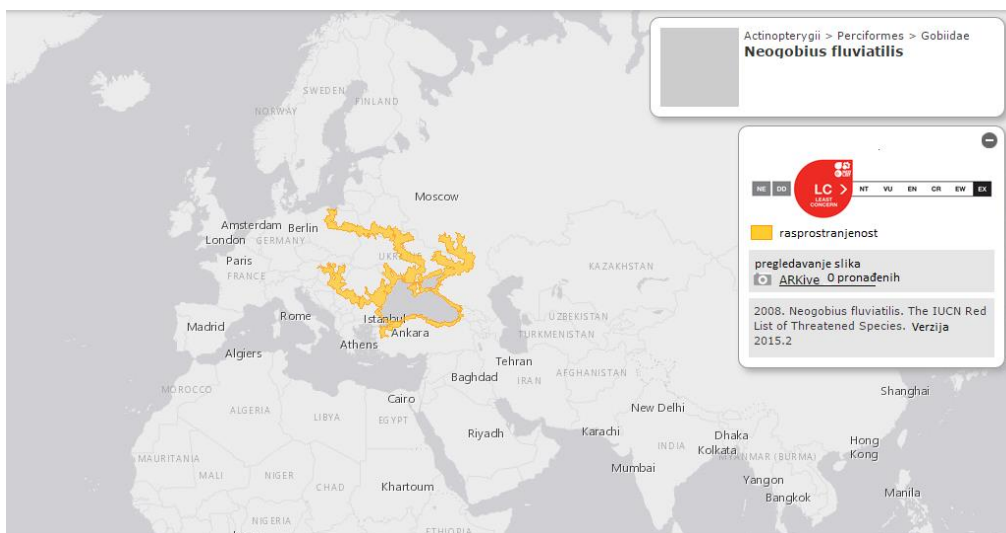
##### **1.1.5. *NEOGOBIOUS FLUVIATILIS* (RIJEČNI GLAVOČIĆ)**

Riječni glavočić je izrazito eurihalina vrsta, autohtona za rijeke i estuarije Crnog i Azovskog mora te Kaspijsko jezero (Slika 1). Posljednjih dvadeset godina, vrsta migrira uzvodno, te je zabilježena u Zapadnom Bugu, pritoku rijeke Visle u Poljskoj, ali je brojna i u većim pritocima Dunava (Tisa u Mađarskoj, Sava u Hrvatskoj). Smatra se da je upravo tamo riječni glavočić postao brojna zahvaljujući antropogenim promjenama i zahvatima na vodotocima, ali i svojem invazivnom karakteru. Nastanjuje slatkovodne ekosustave, kao npr. u Mađarskoj gdje je migrirao uzvodno, ali i polihaline ekosustave u sjevernom dijelu Crnog mora, gdje je zasićenost kisika između 50-60 %. Jedinke ove vrste nađene su čak i u hipersalinim staništima, gdje je zasićenost prelazila preko 40 PSU. Područje današnje rasprostranjenosti ove vrste prikazana je na Slici 2. Vrsta preferira staništa sa pješčanim supstratom, pogotovo u mlađim životnim stadijima, kada se jedinke mogu zakopati u sediment. Riječni glavočić je veći dio života karnivorna vrsta, te mu najveći dio prehrane čine upravo mekušci, iako s promjenom geografske širine, odnosno staništa i ontogenetski tijekom života, može se javiti određen stupanj omnivornosti, te se tada počinje hraniti raznim beskralježnjacima. Za razliku od ostalih vrsta iz roda *Neogobius*, riječni glavočić je izrazito svijetlog obojenja, te se ponekad jedinke doimaju prozirnima, s teško uočljivim ljuskama. Prevladavajuća boja je sivkasto-smeđa s bijelim uzorcima, te crno-smeđim nepravilnim točkama iznad

bočne pruge. Približavanjem reproduktivne sezone, dolazi do izraženog spolnog dvoličja, kada mužjaci postaju kompletno tamnog obojenja, vitkijeg tijela, te sami vrhovi dorzalne i kaudalne peraje poprimaju žućkasto-narančasto obojenje. Reproductivna sezona započinje krajem travnja, kada se temperatura vode, kao glavni ekološki faktor poikilotermnih životinja, dosegne vrijednosti iznad 13 °C. Vrhunac reproduktivne sezone nastupa polovicom svibnja, kada je temperatura vode između 18 i 19 °C. Sezona završava krajem lipnja, a samo u nekim dijelovima, ovisno o sezoni i temperaturi vode, može se produžiti do srpnja (Miller 2004).



**Slika 1.** Riječni glavočić (*Neogobius fluviatilis*) u svom prirodnom okruženju. Preuzeto s Photo Gallery Wildlife Pictures ([http://www.hlasek.com/neogobius\\_fluviatilis1en.html](http://www.hlasek.com/neogobius_fluviatilis1en.html))



**Slika 2.** Rasprostranjenost riječnog glavočića u Europi (podaci za 2008. godinu). Preuzeto i prilagođeno sa [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) (<http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=14521>)

### 1.1.6. GEOLOŠKA POVIJEST SREDOZEMNOG MORA

Uzimajući u obzir navedene sličnosti, Penzo (1998) je na temelju 12S i 16S mitohondrijskih gena rekonstruirao filogenetsko stablo te pokušao razriješiti srodstvene odnose između pojedinih vrsta. Dobiveni rezultati svrstali su vrstu *Padogobius bonelli* kao sestrinsku grupu koja je obuhvaćala vrste *P. nigricans* i *Gobius paganellus*, dok su ostale mediteranske vrste iz roda *Zosterisessor* i *Gobius* bile smještene kao sestrinske cijeloj navedenoj skupini. Diferencijacija i specijacija vjerojatno je u prošlosti bila uzrokovana postepenim odvajanjem Tethys od Paratethys oceana, čime je došlo, prije otprilike 15 milijuna godina (sredina Miocena) do formiranja Sredozemnog bazena. Prije 6 milijuna godina dolazi do intenzivnih oledbi u antarktičkom području zbog čega pada globalna morska razina u prostoru Sredozemlja čime dolazi do intenzivnog oplicavanja i započinje tzv. “*Mesinska kriza saliniteta*” (MSC). Prije oko 5.5 milijuna godina, Paratethys se raspao na niz manjih bazen, dok je istovremeno započelo ispunjavanje Sredozemnog prostora morem iz Atlanskog oceana. Bazeni nastali raspadom Paratethysa najvećim dijelom su se isušili, ili su od njih pak zaostala zaslanjena jezera, kao što je Kaspijsko jezero (more) (Bucković 2006). Smatra se kako je upravo na prijelazu iz Miocena u Pliocen, za vrijeme Mesinske krize, došlo do rapidne evolucije te adaptivnog širenja glavoča koji su naseljavali Mediteransko područje (Miller 2003).

### 1.2. UVOD U BIOAKUSTIKU

Akustični signali prenose ključne informacije o jedinki koja ih producira, ukazujući na njen spol, identitet, fizičko stanje, ali i spremnost na reprodukciju (Bradbury i Vehrencamp 1998). Sistem prepoznavanja partnera u životinjskom carstvu ima izrazito važnu ulogu kao dio cjelokupnog ponašanja životinja, pošto promjene u karakteristikama signala, ali i odgovora na njih, može dovesti do reproduktivne barijere, i na kraju izolacije među pojedinim populacijama, te stoga ima veliki utjecaj na proces nastanka novih vrsta (Dobzhansky 1951, Coyne i Orr 1989, 1997). Stupanj sličnosti akustičnih signala među grupom bliskih, odnosno srodnih vrsta, može poslužiti u utvrđivanju filogenetskih odnosa, kao što je to već učinjeno sa vodozemcima, kukcima, pticama i sisavcima (Robillard i sur. 2006, Tavares i sur. 2006, Cap i sur. 2008, Gingras i sur. 2013). Biolozi su tijekom stoljeća postali izrazito skeptični kada je u pitanju upotreba etologije, odnosno ponašanja, prilikom rekonstrukcije filogenetskih odnosa, prvenstveno zbog velike plastičnosti, ali i visokog stupnja homoplazije (De Queiroz i Wimberger 1993). Tinbergen (1959) je dokazao kako su upravo etološka svojstva jednako relevantna prilikom rekonstrukcije filogenetskih odnosa kao i drugi biljezi (geni, morfološka svojstva, itd.). Većina istraživanja, koja su uključivala etološke podatke u rješavanju sistematskih odnosa, i dalje ostaju vezana uz kukce, za koje se informacije o akustičnim svojstvima dodaju morfološkim istraživanjima (Proctor 1992, Wenzel 1992, Desutter-Grandcolas 1997, Crespi i sur. 1998, Carpenter 1999). Filogenetska relevantnost (vokalnog) ponašanja intenzivnije se istraživala među pojedinim grupama kralježnjaka, prvenstveno ribama (McLennan i sur. 1988, McLennan 1994). Hipoteza zamjene svojstva nalaže kako prirodna selekcija djeluje na producenta signala, primatelja ili obojicu kako bi uklonila moguće pogreške u identifikaciji signala emitiranih od iste vrste (Dobzhansky 1951, Butlin 1987, 1989).

Ribe su najraznolikija skupina kralježnjaka. Također, ribe su razvile najbrojnije i najraznolikije mehanizme za produkciju zvukova uspoređujući sve ostale kralježnjake (Myrberg i Lugli 2006). Pošto ne posjeduju kompleksne slušne aparate za primanje akustičnih signala, ribe mogu producirati samo relativno jednostavne zvukove, za razliku od ostalih tetrapoda (Rice i Bass 2009). Među recentnim

vrstama koštunjača, prepoznata su dva osnovna mehanizama pomoću kojih dolazi do produkcije zvukova. Najrašireniji mehanizam zasniva se na produkciji zvukova pomoću plivaćeg mjehura. Kontrakcijom i relaksacijom mišića plivaćeg mjehura, kao jednih od „najbržih“ mišića kralježnjaka, dolazi do stvaranja akustičnih signala (Kastberger 1981, Fine i sur. 2001, Connaughton 2004, Rice i Bass 2009, Millot i sur. 2011, Parmentier i sur. 2011a). Ostali mehanizmi uključuju struganje kosti jednu uz drugu (Tavolga 1971), vibraciju kosti (Barber i Mowbray 1956, Ladich 1989, Fine i sur. 1997, Parmentier i sur. 2010a), sudaranje zuba (Parmentier i sur. 2007) te vibraciju tetiva (Kratochvil 1985). Produkcija zvukova kod koštunjača detaljno se istražuje zadnjih dvadesetak godina, te su zvukovi zabilježeni za otprilike 800 vrsta iz 109 porodica (Kasumyan 2008). S obzirom na tako veliki broj istraživanih vrsta, filogenetičke analize na temelju akustičnih signala i dalje nedostaju ili su pak u ranom stadiju uzimajući u obzir postojeću literaturu. Također, kod koštunjača kao i kod vodozemaca, akustični signali iznimno su važni i korisni za rekonstrukciju filogenetskih odnosa, upravo zbog svoje instinktivne naravi i stereotipične strukture, ali i doprinosa samoj reprodukciji, tijekom koje oni služe kao osnovno sredstvo privlačenja ili odbijanja partnera (Malavasi i sur. 2008).

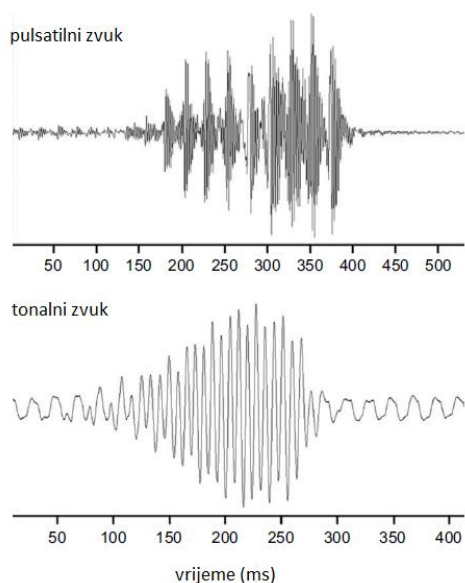
Istraživanja akustičnih signala kao i rekonstrukcija filogenetičkih odnosa do sada su provedena za tri porodice zrakoperki (Pomacentridae, Batrachoididae i Gobiidae) (Malavasi i sur. 2008, Parmentier i sur. 2009, Rice i Bass 2009). Glavoči (Perciformes; Gobiidae) kao jedna od najbrojnija porodica recentnih zrakoperki, najistraživanija su grupa vokalnih riba, unutar koje je produkcija zvukova zabilježena za otprilike 20 vrsta iz 10 porodica (Bass i McKibben 2003, Polgar i sur. 2011). Glavoči prikazuju spektakularnu morfološku, ekološku te etološku raznolikost (Patzner i sur. 2011), stoga se intenzivno koriste kao modeli u raznim komparativnim istraživanjima koja za cilj imaju rješavanje i razumijevanje brojnih evolucijskih procesa (Nakatsuji i sur. 1997, Sayer 2005, Gracey 2008, Ruber i Agorreta 2011). Mužjaci produciraju zvukove tijekom reproduktivnih i agresivnih interakcija, te se mogu podijeliti, uz nekoliko iznimki, u tri kategorije (Slika 3.):

- (1.) pulsatilni zvukovi; niz pulseva ponovljenih tijekom dužeg vremenskog perioda sporijim tempom s višom frekvencijom,
- (2.) tonalni zvukovi; brza stopa ponavljanja pulseva, prilikom čega nastaje kratki zvuk koji formira sinusoidalni val,
- (3.) kompleksni zvukovi; nastaju kombinacijom ranije spomenutih tipova zvuka (Lugli i sur. 1997, Parmentier i sur. 2013).

Agorreta i sur. (2013) po prvi puta pokušali su razriješiti filogenetske odnose između vrsta unutar podreda Gobioidi. Filogenetska analiza temeljila se na istraživanju molekularnih markera (dvije mitohondrijske i tri nuklearne sekvence gena) za 222 vrste. Unutar podreda Gobioidi, za Europui su autohtone otp. 150 vrste unutar 36 rodova. Tijekom istraživanja, Agorreta se oslanjala na podatke iz 2009 (Thacker 2009) gdje se, na temelju molekularnih analiza nuklearne DNA, glavoči dijele na dvije potporodice „Gobiine“ i „Gobioneline“. Rezultati Agorretinog istraživanja potvrdili su postojanje tih dviju grupa. Također, rezultati filogenetskog istraživanja potvrdili su monofiletsko podrijetlo grupe koja se sastoji od sljedećih porodica Odontobutidae, Eleotrididae, Butidae, i Gobiidae. Njihova srodnost bila maksimalno poduprta ML (Maximum Likelihood) i BI (Bayesian Inference) metodama, standardnim metodama za razlučivanje i istraživanje filogenetskih odnosa na temelju molekularnih markera. Treba

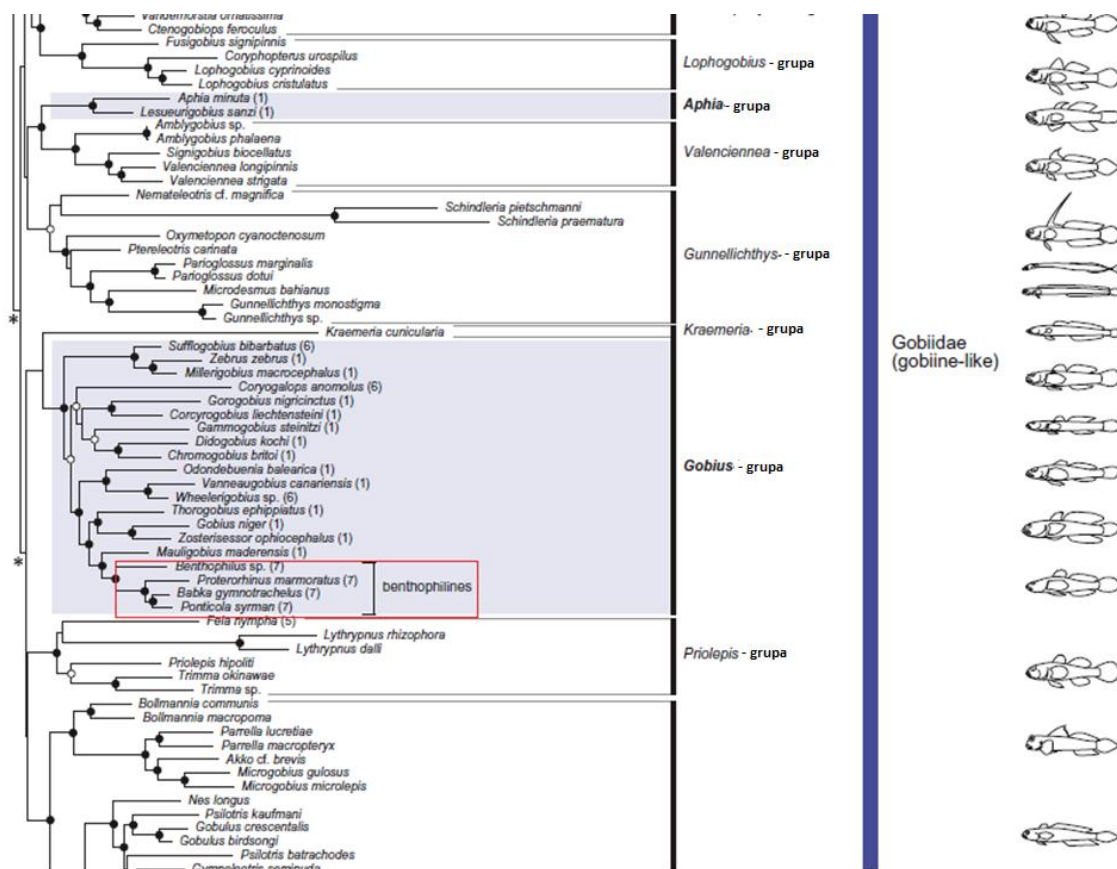
napomenuti kako je upravo porodica Gobiidae (glavoči) najbrojnija unutar podreda Gobiodei, obuhvaćajući skoro 1800 recentnih vrsta.

Dostupnost životinjskih materijala (molekularni marker) omogućilo je opsežno istraživanje filogenetskih odnosa koje je uključilo 28 od 36 autohtonih rodova europskih glavoča. Rezultati su pokazali kako su svi rodovi svrstani u tri odvojene grupe: *Pomatoschistus*-, *Aphia*- i *Gobius*-. *Pomatoschistus*- grupa spada u “Gobionelline” glavoče, dok su zadnje dvije (*Aphia*- i *Gobius*-) dio “Gobiine” glavoča. *Pomatoschistus*- grupa obuhvaća rodove iz skupine “glavoča pijeska” (*Economidichthys*, *Gobiusculus*, *Knipowitschia*, *Pomatoschistus*), ali i druge atlantsko-mediteranske rodove glavoča (*Buenia*, *Deltentosteus*, *Lebetus*, *Speleogobius*) koji su i ranije, na temelju morfoloških te izozimskih analiza, ukazali na srodnost s navedenom grupom (Agorreta i sur. 2013). Vrste iz *Pomatoschistus*- grupe produciraju samo pulsatilne zvukove (Malavasi i sur. 2008, Polgar i sur. 2011, Amorim i sur. 2013). Većina europskih glavoča (17 od 28 uključenih rodova) bilo je smješteno unutar *Gobius*- grupe. Vrste unutar navedene grupe produciraju samo tonalne zvukove (Ladich i Kratochvil 1989, Rollo i sur. 2007, Malavasi i sur. 2008, Sebastianutto i sur. 2008, Polgar i sur. 2011, Parmentier i sur. 2013). Nadalje, Thacker i Roje (2011) dokazali su kako svi europski glavoči (izuzev roda *Pomatoschistus*) imaju monofiletsko podrijetlo, unutar kojega se mogu razlikovati tri komponente: ponto-kaspijski glavoči i mediteranski glavoči kao sestrinske grupe, te afrički glavoči. Važno je napomenuti da je navedena molekularna analiza potvrdila monofiletsko podrijetlo ponto-kaspijskih glavoča, koji su se duboko usadili unutar *Gobius*- grupe (Agorreta i sur. 2013), te samim time potvrdili srodnost sa atlantsko-mediteranskim glavočima (Slika 4).



**Slika 3.** Sonogram pulsatilnog (gore) i tonalnog (dolje) zvuka produciranog od strane glavoča mrkulja (*Gobius paganellus*). Preuzeto i prilagođeno iz Parmentier i sur. (2013).



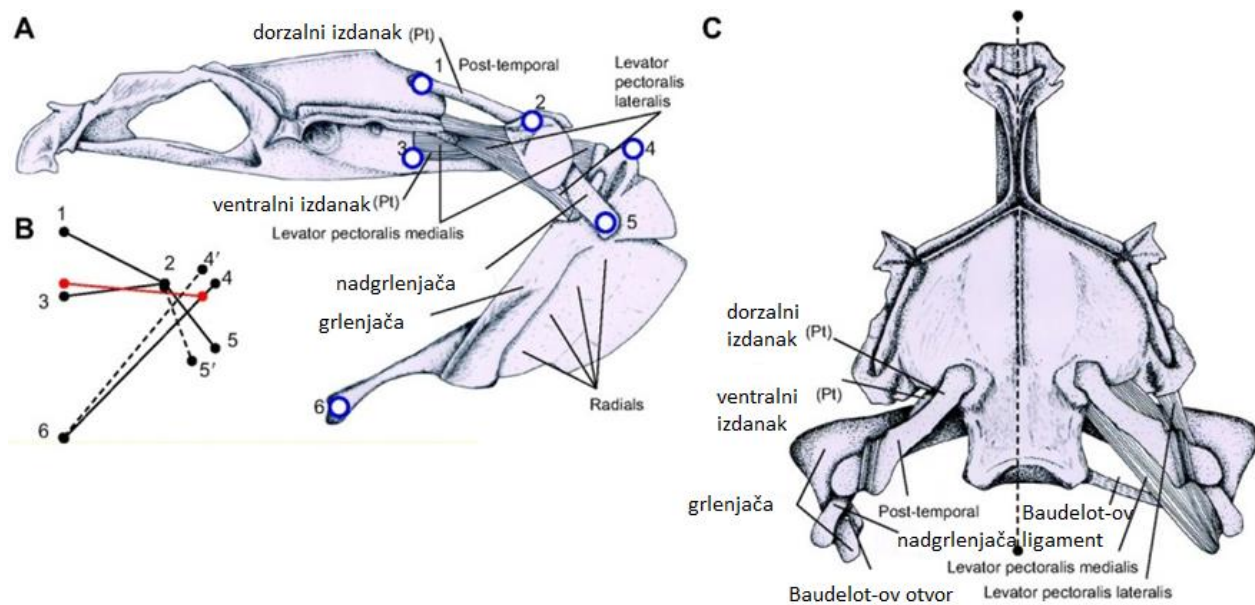


**Slika 4.** Filogenetsko stablo koje prikazuje položaj ponto-kaspijskih glavoča (označeno crvenom bojom) u odnosu na mediteranske vrste iz *Gobius*- grupe te naglašava njihovu međusobnu srodnost na temelju molekularnih markera. Preuzeto iz Agorreta i sur. (2013).

Uzevši u obzir kompleksne geološke prilike koje su vladale krajem Miocena i početkom Pliocena, a imale su utjecaj na evoluciju i specijaciju glavoča (razdvajanje Tethys i Paratethys oceana, Mesinska kriza saliniteta, naknadno punjenje isušenog Mediteranskog bazena morem iz Atlantika) (Penzo i sur. 1998, Huyse i sur. 2004, Miller i sur. 2004, Malavasi i sur. 2008, Vanhove i sur. 2012, Malavasi i sur. 2012), jasno je kako je utvrđivanje filogenetske srodnosti od posebnog interesa, prvenstveno zbog budućih istraživanja akustičnih svojstva.

Kao što je ranije navedeno, pošto je mehanizam koji precizno objašnjava produkciju zvukova i dalje nepoznat, usvojena je teorija predložena od strane Parmentier i sur. (2013), koji je predložio, na temelju elektromiografskih analiza, da se zvukovi kod glavoča mrkulja (*Gobius paganellus*) stvaraju kranio-pektoralnim mehanizmom, odnosno kontrakcijom i relaksacijom *levator pectoralis* mišića koji se nalazi na posteriornom dijelu lubanje, te se veže na dorzalni dio *os cleithrum*, odnosno grlenjače (Slika 5).





**Slika 5.** Prikaz kranio-pektoralnog mehanizma (A- lateralni pogleda na neurocranium, *levator pectoralis* mišić i prsni pojas, B-shematski prikaz mehanizma, C- dorzalni pogleda na neurocranium, *levator pectoralis* mišić i prsni pojas) pomoću kojeg dolazi do produkcije zvukova kod glavoča mrkulja (*G. paganellus*). Preuzeto iz Parmentier i sur. (2013).

### 1.3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Unatoč nekoliko zvukova snimljenih za mramorastog glavoča (*Proterorhinus marmoratus*) (Ladich i Kratochvil 1989) i glavoča okrugljaka (*Neogobius melanostomus*) (Rollo i sur. 2007) vokalni repertoar ponto-kaspijskih vrsta i dalje ostaje nepoznat.

Stoga je osnovni cilj istraživanja bio istražiti i opisati vokalni repertoar ponto-kaspijskog riječnog glavočića *Neogobius fluviatilis* (Pallas, 1814), te usporediti njegove akustične signale sa signalima vokalnih mediteranskih vrsta koje prema Agorreta i sur. (2013) pripadaju neformalnoj *Gobius*- grupi.

Koristeći rezultate akustičnih analiza, ali i postojeće literaturne podatke (Penzo i sur. 1998, Malavasi i sur. 2008, Agorreta i sur. 2013), sekundarni cilj istraživanja bio je procijeniti stupanj srodnosti riječnog glavočića s mediteranskim vrstama. Tijekom istraživanja koristili smo talijanskog glavočića *Padogobius nigricans* (Canestrini, 1867) kao komparativnu vrstu iz *Gobius*- grupe, čije je zvukove zabilježio Lugli i sur. (1995), te ih klasificirao tonalnim. Pošto obje navedene vrste dijele niz morfoloških karakteristika, za očekivati je bilo kako će i akustični signali biti slični. Navedena sličnost dodatno bi poduprijela našu pretpostavku kako su ponto-kaspijski i mediteranski glavoči srodni bez obzira na geografsku odvojenost.

Posljednji cilj istraživanja bio je uz pomoć dobivenih rezultata, objasniti paleoklimatske i paleogeološke uvjete za vrijeme kojih je došlo do specijacije pojedinih vrsta.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. UZORKOVANJE I SMJEŠTAJ RIBA

Istraživanje vokalnog repertoara riječnog glavočića provedeno je tijekom 2014. godine, te se s obzirom na lokacije i obujam rada, može podijeliti u dva dijela: terenski i eksperimentalni dio. Terenski dio istraživanja proveden je tijekom ožujka i travnja 2014. godine u Hrvatskoj. Glavni cilj terenskog istraživanja je bilo skupljanje jedinki koje bi se kasnije koristile u eksperimentalnom dijelu istraživanja. Sve jedinke (N=62) uhvaćene su na lokaciji u blizini umjetno stvorenog Kupa-Kupčina kanalnog sustava (GPS koordinate:  $\varphi = 45\ 31\ 53.7\ N$ ,  $\lambda = 15\ 47\ 18.5\ E$ ,  $z = 93.2\ m$ ). Riječni glavočić je u Hrvatskoj alohtona (strana) vrsta, te kao takav nije autohton za središnji i južni dio Europe, uključujući Italiju. U svrhu prikupljanja jedinki istraživanje je provedeno uz pomoć agregata za elektroribolov, izlazne snage 7.5 kW. Tijekom uzorkovanja jedinke nisu ozlijeđene ili ubijene. Ovakva metoda uzorkovanja je prihvatljiva prvenstveno zbog svoje neselektivnosti, ali i mogućnosti vraćanja neozlijeđenih jedinki natrag u vodu.

Eksperimentalni dio istraživanja proveden je u Italiji u razdoblju od kraja ožujka do početka lipnja 2014. godine, što se podudara s reproduksijskom sezonom istraživane vrste, kada jedinke produciraju zvukove. Nakon što su bile uhvaćene, jedinke su iz Hrvatske transportirane u laboratorij koji se nalazi u sklopu "Ca Foscari" Sveučilišta u Veneciji, gdje su bile smještene u odgovarajuće akvarije. Kako je terenski dio istraživanja proveden dva puta tijekom ožujka i travnja, svaki put kada bi jedinke dospjele u laboratorij u Italiji bile bi razdvojene po spolu na temelju urogenitalne papile (Miller 1984). Veće jedinke (> 10 cm) koje su se koristile u eksperimentu, bile su smještene pojedinačno u manje staklene akvarije kapaciteta 120 litara, dok su manje jedinke (< 10 cm) bile smještene u veće akvarije kapaciteta 300 litara. Pošto je za glavoče karakteristično teritorijalni ponašanje za vrijeme reproduksijske sezone (mužjak čuva gnijezdo ili mjesto na koje ženka polaže jaja) u svaki akvarij postavili smo "sklonište" načinjeno od PVC cijevi, ili komada crijepa, prerezanih na pola.

Akvariji su bili zvučno izolirani plastičnim materijalom od okolne buke, koja je potencijalno mogla narušiti snimanje zvukova. Svaki akvarij bio je opremljen sustavom za filtriranje vode, slojem pješčanog supstrata debljine 5-10 cm, te aeratorima koji su održavali zadovoljavajuću razinu otopljenog kisika u vodi. Kako bi uvjeti u akvarijima što više sličili uvjetima u okolišu u kojemu jedinke žive, temperatura (raspon 19-21°C) i salinitet (0,05 PSU) su bili konstantni tijekom cijelog eksperimenta. Jedinke su bile izolirane 5-7 dana u akvariju kako bi se aklimatizirale na nove uvijete, te kako bi se oporavile od proživljenog stresa. Tijekom istraživanja jedinke su hranjene larvama trzalaca (Chironomidae) te mediteranskim dagnjama (*Mytilus galloprovincialis*) *ad libitum*.

### 2.2. SNIMANJE ZVUKOVA

Eksperiment je bio proveden metodom pasivne akustike, koja se posljednjih pedeset godina koristi u istraživanju biologije riba, ali i u akvakulturi i marikulturi (Fish i sur. 1952, Fish i Mowbray 1970). Od tada, takva metoda pokazala se izrazito korisnom za utvrđivanje ugroženih staništa, monitoring i zaštitu staništa važnih za reprodukciju riba, ali i za proučavanje njihovog ponašanja (Hawkins 1986, Rountree i sur. 2003a, 2003b). Pokušali smo snimiti zvukove tijekom agresivnih interakcije mužjaka s drugim

mužjakom i ženke s drugom ženkom, te tijekom interakcije mužjaka sa ženkom, koja bi potaknula potencijalnog partnera na udvaranje te na kraju i mrijest, prilikom čega bi on producirao zvukove. Prateći protokol (Malavasi i sur. 2008), jedinka (mužjak ili ženka) za koju se prethodno utvrdilo da će biti korištena u eksperimentu kao „domaćin“ („resident“), izolirala se na nekoliko dana u manji akvarij (120 litara) kako bi uspostavila teritorijalno ponašanje. Svaki akvarij s izoliranom jedinkom bio je opremljen skloništem od plastike (10 x 20 cm). Neposredno prije početka snimanja zvukova, ispred ulaza u sklonište, druga jedinka tzv. „nametljivac“ („intruder“) bila je smještena u metalni kavez kako ne bi došlo do fizičkog kontakta, ali ujedno kako bi inducirala produkciju zvukova „domaćina“. Također, svakoj jedinki je prije eksperimenta kaliperom izmjerena ukupna dužina tijela. Sva svjetla u laboratoriju su ugašena 10-15 minuta prije početka snimanja radi uklanjanja buke, te je temperatura vode izmjerena, radi standardizacije podataka.

Zvukovi su snimani pomoću hidroфона израђеног према нарудби (Gulton industries; osjetljivost: -164 dB, odgovor na frekvencije  $\pm 3$  dB od 30 Hz do 2 kHz), koji je tijekom eksperimenta bio smješten ispred ulaza u sklonište, na udaljenosti od 20 cm prateći protokol (Malavasi i sur. 2008). Hidrofon je bio spojen na pojačavač struje (B&K 2626), koji se nastavljao na prijenos digitalnog audio rekordera (TASCAM LINEAR PCM RECORDER; wav 16/44,1 k mono). Zvukovi su se tijekom eksperimenta pohranjivali na memorijsku karticu audio rekordera, nakon čega se ona ubacila u osobno računalo zbog statističke i audio obrade zvukova. KRAUN slušalice bile su spojene na audio rekorder zbog snimanja kvalitetnijih zvukova tijekom eksperimenta. Ukupno gledajući, zvukovi su snimljeni za 13 jedinki, od kojih je 8 bilo mužjaka i 5 ženki. Od 8 mužjaka korištenih tijekom eksperimenta, njih 4 je produciralo zvukove tijekom agresivnih interakcija s drugim mužjakom, dok ih je 4 produciralo zvukove tijekom reproduktivnih interakcija s gravidnom ženkom. Standardno vrijeme snimanja bilo je 30 minuta od produkcije prvoga zvuka.

### 2.3. OBRADA AKUSTIČNIH SIGNALA

Akustični signali analizirani su koristeći Avisoft-SASLab Pro softver. Signali su digitalizirani na 1500 Hz te filtrirani u rasponu od 50 do 500 Hz kako bi se uklonili okolna buka ili zvukovi antropogenog podrijetla, koji su mogli narušiti izgled zvučnog vala pojedinog signala. Kako bi se što bolje prikazala akustična svojstva pojedinog zvuka, istražili smo te grafički prikazali spektrogram, sonogram i spektar snage pojedinog zvuka, što nam je omogućio sam softver (vrsta prozora: hamming; FFT: 256; okvir: 100; širina vrpce: 8Hz; rezolucija: 5 Hz; preklapanje: 93,75 %).

Sljedeća akustična svojstva bila su izmjerena kako bi se što preciznije odredio tip akustičnih signala te okarakterizirao sam zvuk (Malavasi i sur. 2008):

1. Trajanje zvuka izraženo u milisekundama (DUR);
2. Broj pulseva (NP);
3. Stopa ponavljanja pulseva izražen u hercim (PRR; dobiven dijeljenjem broja pulseva s trajanjem zvuka);
4. Maksimalna vrijednost frekvencije (PF; očitavanje vrijednosti iz spektra snage);
5. Modulacija frekvencije izražena u hercima (FM; izračunata kao razlika između krajnje i početne PRR vrijednosti zvuka).

Navedena akustična svojstva izmjerena su i za talijanskog glavočića (*Padogobius nigricans*) kako bi mogli usporediti njegove vrijednosti s vrijednostima akustičnih svojstva riječnog glavočića.

## 2.4. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Kako bi odredili stupanj varijabilnosti zvukova (tj. stupanj stereotipnosti), izračunali smo koeficijent varijabilnosti ( $CV = (SD/X) \times 1000$ ) za navedena akustična svojstva, koristeći netransformirane podatke. Koeficijent varijabilnosti ukazuje na stupanj varijabilnosti zvukova (razlikuju li se zvukovi u svojim karakteristikama ovisno o pojedinoj jedinki ili između samih jedinki), uzimajući u obzir standardan broj zvukova za svaku jedinku ( $N=10$ ). Kako bi odredili koeficijent varijabilnosti, za sva istražena akustična svojstva pojedinih jedinki ( $N=13$ ) izračunata je srednja vrijednost, nakon čega je izračunat koeficijent varijabilnosti zvukova unutar samih jedinki ( $CV_w$ - “within”) te koeficijent varijabilnosti između jedinki ( $CV_b$ - “between”). Nakon toga,  $CV_b/CV_w$  omjer izračunat je u svrhu određivanja koeficijenta varijabilnosti, tj. stupnja stereotipnosti zvukova. Prema teoriji, zvuk je stereotipan ukoliko je vrijednost omjera veća od 1,0. Kako bi dokazali postojanje li razlike u akustičnim svojstvima mužjaka i ženki tijekom reproduktivnih i agresivnih interakcija, primijenili smo T-test, nakon logaritamske transformacije podataka. Također, kako bi istražili ovisnost fizikalnih svojstava (veličina tijela i temperatura) o akustičnim karakteristikama pojedinih jedinki, primijenili smo i izračunali Pearson-ovu korelaciju pomoću STATISTICA softvera.

Srodnost riječnog glavočića s ostalim vokalnim vrstama iz rodova *Gobius*, *Padogobius* i *Zosterisessor* iz tzv. *Gobius*- grupe, (*sensu* Agorreta i sur. 2013), pokušali smo odrediti koristeći podatke (snimke zvukova) dobivene od Malavasi i sur. (2008). Kako bi istražili srodnost riječnog glavočića s ostalim vrstama, na temelju akustičnih svojstva, primijenili smo multivarijantni pristup. Faktorijalnom diskriminantnom funkcijskom analizom (Discriminant Function Analysis; DFA), u koju smo ubacili logaritamski transformirane podatke za tri akustična svojstva (DUR, PRR, PF) koja su se pokazala nezavisnima, odnosno nisu korelirala međusobno, pokušali smo odrediti kako će jedinke navedenih vrsta (*Padogobius bonelli*; podijeljen na dvije komponente, pulsatilnu i kompleksu, (Malavasi i sur. 2008)) biti grupirane s obzirom na strukturu zvuka (tj. tip zvuka koji one produciraju). Statistički značajne razlike između vrsta izračunate su pomoću Mahalanobis-ove udaljenosti.

### 3. REZULTATI

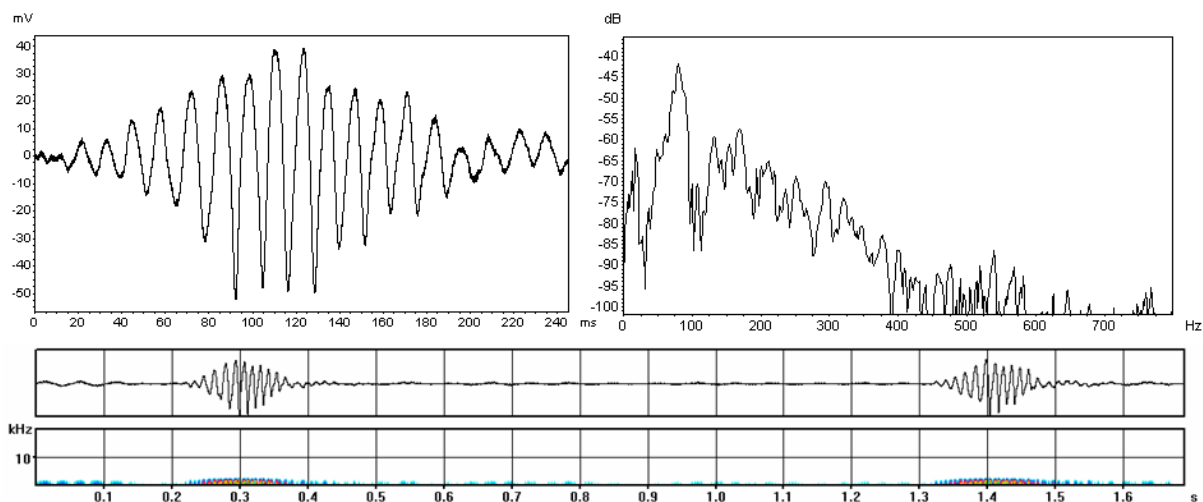
Riječni glavočić producira niz kratkih zvukova tijekom agresivnih i reproduktivnih intraspecijskih interakcija. S obzirom na fizička svojstva, svaki zvuk tipični je periodički, longitudinalni (uzdužni) sinusni val koji se sastoji od brzo-ponavljajućih pulseva, kojima se može opisati amplituda i frekvencija (Slika 6) Spektar snage pokazuje kako je većina energije zvuka koncentrirana u uskom rasponu od 60 do 100 Hz, sa prosječnom vrijednosti oko 80 Hz (Tablica 1). Navedene karakteristike ukazuju kako se radi o tonalnom zvuku. Svaki zvuk dio je kontinuiranog niza, u kojem intra-zvučni period (period između završetka jednog i početka drugog zvuka) traje između 1,3 i 1,6 sekundu. Trajanje zvukova iznosi od 127 do 226 milisekundi (ms), s prosječnom vrijednosti od 169,3 ms. Pošto se zvuk može podijeliti na tri dijela (početni, srednji i krajnji), zabilježeno je kako amplituda zvuka raste tijekom prve dvije trećine, te se tijekom zadnje trećine ona smanjuje (Slika 1) Prosječna vrijednost modulacije frekvencije (FM) iznosi od 2 do 13 Hz, što ukazuje na neznatno povišenje modulacije, odnosno ranije navedeno stanje prilikom kojega amplituda raste, pa se drastično smanjuje. Broj pulseva unutar svakoga zvuka varira između 8 i 16, sa srednjom vrijednosti od 12,3 (Tablica 1). Stopa ponavljanja pulseva kreće se u rasponu od 69 do 81 Hz, s prosječnom vrijednosti od 73,6 Hz (Tablica 1) što se poklapa sa srednjom vrijednosti najviše frekvencije od 77 Hz. Takvo poklapanje vrijednosti još jednom ukazuje na harmoničku i tonalnu strukturu zvukova. Talijanski glavočić (*Padogobius nigricans*) s obzirom na akustična svojstva (Lugli i sur. 1995, Malavasi i sur. 2008) ukazuje na blisku srodnost s riječnim glavočićem (Slika 8). Provedeno istraživanje pokazuje kako se trajanje zvuka, frekvencija, stereotipnost i akustična struktura zvuka talijanskog glavočića preklapaju s akustičnim svojstvima riječnog glavočića

Istražujući strukturalna svojstva zvukova, pokazalo se kako su oni izrazito nepromjenjivi (nevarijantni) s obzirom na etološki kontekst (reproduktivni/agresivni), ali i na spol jedinki, potvrđujući time svoju stereotipnost, pošto su jedinke tijekom eksperimenta emitirale samo jedan tip zvuka. Od svih pet istraživanih akustičnih svojstva, jedino su DUR i NP (tijekom reproduktivnih interakcija) i PRR (tijekom agresivnih interakcija) imale  $CVb/CVw$  omjer veći od 1,0 (Tablica 2) potvrđujući time veću inter-individualnu raznolikost. Stereotipna struktura zvukova, zajedno s informacijama koje oni nose, ključna je za prepoznavanje jedinki. Do produkcije zvukova došlo je kada su jedinke plivale kroz vodeni medij ili za vrijeme ležanja na dnu akvarija. Neposredno prije emisije zvukova, došlo je do naglog podizanje glave uz dorzolateralne pokrete škržnog poklopca. Mužjaci su, tijekom reproduktivnih interakcija, značajno promijenili obojenost tijela, te postepeno postali tamniji ili kompletno crne boje. Ženke su, za razliku od mužjaka, zadržale svijetlo, ponekad polu-prozirno obojenje. Morfološke razlike između mužjaka i ženki kao i njihovo obojenje tijekom eksperimenta poslužili su nam kao pouzdani indikator o kojem se tipu interakcija radi. T-test je pokazao kako nije postojala statistički značajna razlika između akustičnih svojstva s obzirom na kontekst ponašanja, ali i spol jedinki (T-test,  $P > 0,05$ ). Također, nije postojala statistički značajna povezanost (korelacija) između akustičnih svojstva i fizikalnih svojstva (temperature i veličina tijela) (Pearson Correlation,  $n = 13$ ,  $P > 0,05$ ).

Koristeći vrste kao grupne varijable tijekom DFA analize, sve jedinke bile su pravilno raspoređene u odgovarajuće vrste sa 88,46 % točnosti klasifikacije. Prva diskriminantna funkcija (Faktor 1), doprinosi varijanci sa 65,4 %, te je odgovorna za varijabilnost među vrstama na temelju koje se mogu prepoznati tri grupe: 1) *Gobius paganellus*, *Padogobius bonelli* (tonalna komponenta), *Padogobius nigricans* i *Neogobius fluviatilis*, smješteni unutar pozitivnih vrijednosti osi, 2) *Gobius cobitis*,

*Padogobius bonelli* (pulsatilna komponenta) i *Gobius niger* na središnjem dijelu dijagrama i 3) *Zosterisessor ophiocephalus*, karakteriziran produkcijom pulsatilnih zvukova, smješteni unutar negativnih vrijednosti osi (Slika 7) Kao što je vidljivo iz Tablice 3, prva diskriminantna funkcija, na temelju standardnih strukturnih koeficijenata (“standard structure coefficients“) razdvojila je vrste s visokim PRR i niskim DUR i PF vrijednostima (desna strana dijagrama; vrste koje produciraju tonalne zvukove) od vrsta s niskim PPR i visokim DUR i PF vrijednostima (lijeva strana dijagrama; vrste koje produciraju pulsatilne zvukove) ukazujući kako na varijabilnost izrazito utječe PRR.

Druga diskriminantna funkcija doprinosi varijanci sa 30,1 %, podupirući razdvajanje vrsta s obzirom na tip produciranog zvuka (tonalni/pulsatilni). Također, i u ovom slučaju stopa ponavljanja pulseva (PRR) najvažnije je akustično svojstvo koje doprinosi razdvajanju vrsta. PRR, PF i DUR snažno i negativno doprinose varijanci (Tablica 3). Riječni glavočić smješten je u gornjem desnom kutu dijagrama, stoga njegove zvukove možemo karakterizirati kao zvukove visokih PRR i niskih PF vrijednosti.



**Slika 6.** Sonogram (lijevo) i spektar snage (desno) zvuka riječnog glavočića (*Neogobius fluviatilis*). Donja slika prikazuje niz od dva uzastopna zvuka u stvarnom vremenu (sekunde) čiji su sonogrami također prikazani.

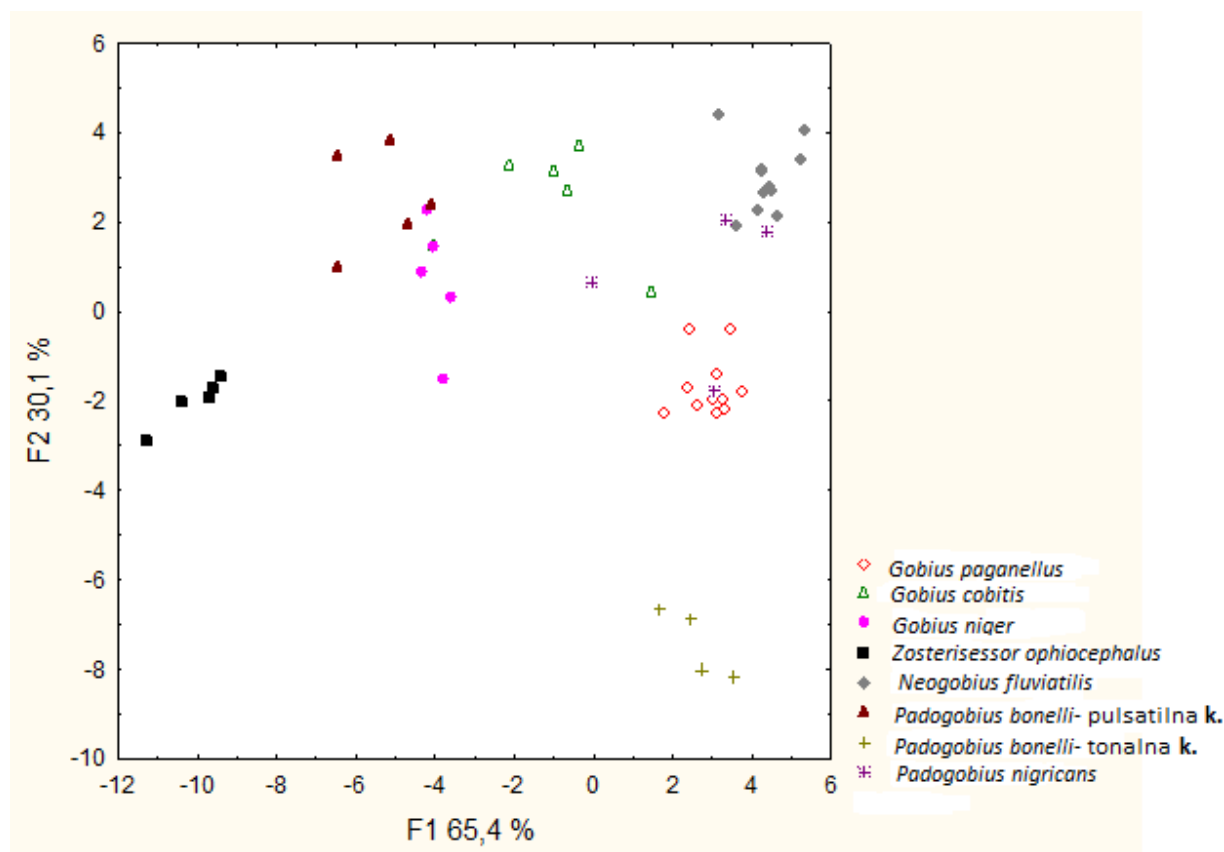
**Tablica 1.** Srednje vrijednosti ( $\pm$  s.d.) izračunate za ukupnu veličinu tijela, temperature vode, i svih pet akustičnih svojstva, tijekom agresivnih i reproduktivnih interakcija jedinki.

		<b>Mužjak</b>	<b>Ženka</b>
		<b>(n=8)</b>	<b>(n=5)</b>
Veličina tijela (mm)	Agresivna	132,75 $\pm$ 8,3	116,2 $\pm$ 11,8
	Reproduktivna	128,5 $\pm$ 11,2	-
Temp (°C)	Agresivna	20,25 $\pm$ 0,4	19,8 $\pm$ 0,4
	Reproduktivna	20,0 $\pm$ 0	-
DUR (ms)	Agresivna	179,05 $\pm$ 29,5	163,62 $\pm$ 20,5
	Reproduktivna	161,075 $\pm$ 38,5	-
NP	Agresivna	12,75 $\pm$ 1,3	12,2 $\pm$ 1,3
	Reproduktivna	12,05 $\pm$ 2,9	-
PRR (Hz)	Agresivna	72,615 $\pm$ 8,8	74,4 $\pm$ 2,4
	Reproduktivna	74,895 $\pm$ 1,0	-
PF (Hz)	Agresivna	77,295 $\pm$ 6,6	78,4 $\pm$ 2,4
	Reproduktivna	78,875 $\pm$ 3,6	-
FM	Agresivna	9,4075 $\pm$ 2,1	11,8 $\pm$ 3,5
	Reproduktivna	8,375 $\pm$ 5,6	

**Tablica 2.** CV vrijednosti (CVb -između i CVw -unutar jedinki) i njihov omjer izračunat za svih pet akustičnih svojstva, tijekom agresivnih i reproduktivnih interakcija.

Akustična svojstva	CVw		CVb		CVb/CVw	
	Agr.	Repr.	Agr.	Repr.	Agr.	Repr.
DUR (ms)	0,2	0,15	0,16	0,23	0,81	1,51
NP	0,21	0,17	0,11	0,24	0,54	1,41
PRR (Hz)	0,06	0,06	0,08	0,01	1,25	0,21
PF (Hz)	0,09	0,47	0,06	0,34	0,63	0,71
FM	0,91	0,23	0,37	0,87	0,40	3,69

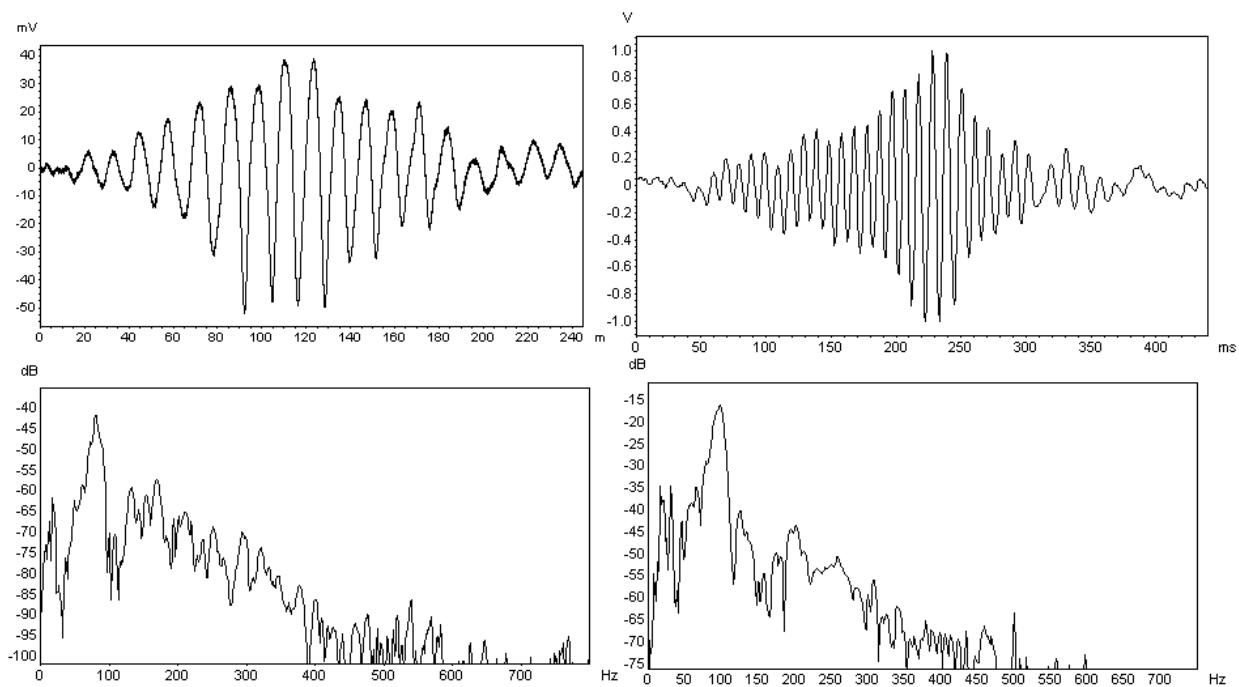




**Slika 7.** Usporedba, 1. i 2. diskriminantne funkcije, gdje su jedinke označene kao vrste (različiti simobli označavaju različite vrste). Faktor 1 razdvaja vrste s obzirom na strukturu tj. tip produciranog zvuka, grupirajući vrste sa niskom stopom ponavljanja pulseva (lijeva strana dijagrama) od vrsta sa visokom stopom ponavljanja pulseva (desna strana dijagrama).

**Tablica 3.** Rezultati Faktorijalne diskriminantne funkcijske analize. Vrste su označene kao grupne varijable, dok su tri nezavisna akustična svojstva označena kao zavisne varijable. Strukturni faktorski koeficijenti predstavljaju korelaciju između vrsta/jedinki kao zavisnih varijabli i rezultata diskriminantnih funkcija, te stoga doprinose u klasificiranju pojedinih zavisnih varijabli.

Akustična svojstva	Standardizirani koeficijenti		Faktorijalni strukturni koeficijenti	
	DF1	DF2	DF1	DF2
DUR	- 0,39	-0,62	- 0,11	-0,15
PRR	0,90	-0,55	- 0,67	0,20
PF	- 0,89	-0,77	- 0,38	0,64



**Slika 8.** Usporedba sonograma i spektra snage riječnog glavočića (lijevo, gore i dolje) sa sonogramom i spektrom snage talijanskog glavočića (desno, gore i dolje). Zvukovi navedenih vrsta poklapaju se svojom strukturom i akustičnim svojstvima.

#### 4. RASPRAVA

Vokalni repertoar ponto-kaspijskih vrsta i dalje je poprilično neistražen, s obzirom na broj vrsta koje nastanjuju navedeno područje. Rolo i sur. (2007) zabilježili su nekoliko zvukova glavočića okrugljaka (*Neogobius melanostomus*) te ih kvalificirali pulsatilnima s obzirom na akustična svojstva. Za pretpostaviti je, s obzirom na postojeću literaturu (Medvedev i sur. 2013) kako glavočić okrugljak, najbliži srodnik riječnom glavočiću, također producira tonalne zvukove. Ladich i Kratochvil (1989) snimili su zvukove mramorastog glavoča (*Proterorhinus marmoratus*), te ih prema strukturi i akustičnim svojstvima klasificirali tonalnim. Zvukovi mramorastog glavoča slični su, s obzirom na akustična svojstva, zvukovima riječnog glavočića, te je važno za nadodati kako su mužjaci i ženke mramorastog glavoča tijekom agresivnih interakcija kao i mužjak tijekom reproduktivnih producirali zvukove, što je tipično za ponto-kaspijske vrste. Zanimljivo je kako su sve navedene vrste izrazito migratorne, s obzirom da je nekoliko vrsta (mramorasti glavoč i glavočić okrugljak) zabilježeno u Velikim jezerima (Sjeverna Amerika), gdje su vjerojatno dospjeli balastnim vodama. Riječni glavočić kontinuirano širi svoj areal, što potvrđuju nedavni primjerci uhvaćeni u rijeci Kupi i Uni (Delić i sur. 2014).

Talijanski glavočić endemska je vrsta izrazito ograničenog areala, koja naseljava isključivo slatkovodne ekosustave zapadnog dijela talijanskog poluotoka (Miller 2004). Stoga, jasno je kako su obje vrste poprilično geografski odvojene. Kao što je ranije navedeno, vrste iz roda *Padogobius* i ponto-kaspijske vrste sinapomorfne su s obzirom na posjedovanje velikog broja kralježaka, ali i zbog odsutnosti plivaćeg mjehura te modificiranog kostura. Talijanski glavočić kao i riječni ne posjeduju plivači mjehur, za razliku od mnogih drugih vrsta glavoča. Također, molekularna istraživanja provedena u svrhu određivanja filogenetskih odnosa grupirala su ponto-kaspijske glavoče sa mediteranskim vrstama iz rodova *Gobius*, *Padogobius*, *Zosterisessor* i *Zebrus* (Tacker i Roje 2011, Agorreta i sur. 2013). Rezultati provedenog istraživanja potvrđuju blisku filogenetsku srodnost vrsta iz *Gobius* grupe s obzirom na akustična svojstva. Riječni glavočić grupiran je zajedno s vrstama iz roda *Padogobius* i glavočem mrkuljem (*Gobius paganellus*), čiji su tonalni zvukovi također karakterizirani visokom stopom ponavljanja pulseva (PRR). Zanimljivo je napomenuti kako obje vrste iz roda *Padogobius*, ali i glavoč mrkulj, naseljavaju sličan tip staništa kao i riječni glavoč. Navedene vrste preferiraju staništa sa pijeskom/šljunkom/kamenjem, na dnu rijeke ili unutar zone plime i oseke (Penzo i sur. 1998).

Nadalje, Penzo i sur. (1998) otkrili su kako dvije slatkovodne vrste iz roda *Padogobius* (*P. nigricans* i *P. bonelli*), iako genetski bliske, nisu sestrinske pošto se talijanski glavočić (*P. nigricans*) pokazao kao sestrinska vrsta glavoču mrkulju, jednom od rijetkih morskih vrsta koja nastanjuje šljunkovito/kamenito stanište. Našim istraživanjem glavoč travaš (*Zosterisessor ophiocephalus*) i glavoč blataš (*Gobius niger*) grupirani su zajedno, pošto produciraju pulsatilne zvukove niskih PRR vrijednosti. Navedeni odnos potvrđuje rezultate prijašnjih molekularnih i akustičnih analiza (Penzo i sur. 1998, Malavasi i sur. 2008, Medvedev i sur. 2013). Budući da je odnos između vrsta uključenih u naše istraživanje (*Neogobius*, *Padogobius*, *Zosterisessor*, *Gobius*) potvrđen ranijim molekularnim i akustičnim analizama, smatramo kako je upravo stopa ponavljanja pulseva (PPR), najvažnije akustično svojstvo presudno u diskriminaciji i prepoznavanju vrsta. Stopa ponavljanja pulseva predstavlja stupanj do kojega se pulsevi slažu jedan do drugoga, čineći kontinuirani pulsatilni niz ili zbijeni tonalni zvuk. Stoga, smatramo kako upravo navedeno svojstvo predstavlja određeni informativni “filogenetski signal”. Ranijim

istraživanjima kao i našim rezultatima (Malavasi i sur. 2008, Agorreta i sur. 2013) potvrđena je povezanost između akustičnih svojstva (stopa ponavljanja pulseva) i filogenetskog odnosa pojedinih vrsta.

Uzevši u obzir postojeću literaturu i geografsku odvojenost dviju vrsta iz roda *Padogobius*, može se pretpostaviti kako je do razvoja slatkovodnog života došlo nezavisno nekoliko puta tijekom evolucijske povijesti. Riječni glavočić pak, s obzirom na svoju eurihalinost, ali i migratorni karakter, može pružiti brojne odgovore vezane uz podrijetlo, migracije i današnju rasprostranjenost glavoča diljem Mediterana. Provedeno istraživanje grupiralo je riječnog glavočića s ostalim tonalnim vrstama (*Padogobius* kompleks i glavoč mrkulj). Time je potvrđeno kako navedene vrste dijele zajedničko podrijetlo (Penzo i sur. 1998, Huyse i sur. 2004).

Ukratko, ukoliko slijedimo postojeću literaturu, moguće je rekonstruirati paleoklimatske i geološke prilike koje su dovele do današnje raznolikosti glavoča u Europi, ali i filogenetske srodnosti navedenih vrsta. Za vrijeme ranog/srednjeg Miocena (24-15 milijun godina) došlo je do stvaranja Panonskog kanala, koji je omogućio ribama migraciju iz Ponto-kaspijskog bazena, tj. tadašnjeg Paratethys-a u Mediteransko područje. Moguće je kako je upravo zajednički predak, koji je naseljavao Ponto-kaspijsko područje (Paratethys) migrirao tim putem. Prije 5,5 milijuna godina, za vrijeme Mesinske krize saliniteta (MSC), došlo je do potpunog isušivanja Mediteranskog područja uslijed evaporacije, čime su se stvorila hiper i hipohalina jezera (Huyse i sur. 2004). Neka od tih hipohalinih jezera poslužila su kao refugiji migratornim eurihalinim vrstama, koje su se zatekle u njima. Takve vrste morale su se prilagoditi novim ekološkim uvjetima, tj. slatkoj vodi. Navedena izolacija vjerojatno je potaknula intenzivni razvoj endema diljem Mediteranskog područja (*Padogobius* kompleks) (Miller 1990). Nakon otvaranja Gibraltarskih vrata (5,33 milijuna godina) i završetkom Mesinske krize saliniteta došlo je do naknadnog ispunjavanja Mediterana morskom vodom, te je navedeno područje ponovno postalo morsko stanište. Uzimajući u obzir današnju rasprostranjenost glavoča diljem Mediterana, moguće je kako se upravo tada zajednički predak morao prilagoditi na novonastalo stanište. Nastankom novih slobodnih ekoloških niša, ponovno je došlo do adaptivne radijacije, što je rezultiralo današnjom raznolikošću glavoča diljem Mediteranskog bazena. S obzirom na migratorni karakter i svoju eurihalinost, ali i na navedenu filogenetsku srodnost s mediteranskim vrstama, pretpostavljamo kako je upravo riječni glavočić ili ancestralna vrsta slična njemu tijekom evolucijske povijesti bio sposoban naseliti nova staništa, migrirajući izvan ponto-kaspijskog bazena. Slično Mesinsko i post-Mesinsko podrijetlo “glavoča pijeska” predložio je Malavasi i sur. (2012), koji je rekonstruirao filogenetske odnose na temelju etoloških obrazaca.

Mogući problemi prilikom utvrđivanja filogenetskih odnosa mogu se pojaviti prvenstveno zbog utjecaja konvergentne evolucije, koja značajno utječe na glasanje životinja, kao što je to zabilježeno kod vodozemaca, tj. bezrepaca (Robillard i sur. 2006, Tavares i sur. 2006, Cap i sur. 2008, Gingras i sur. 2013). Kako bi razdvojili doprinos akustične komunikacije od učinka konvergentne evolucije, potrebna su buduća komparativna molekularna i akustična istraživanja, uz koja je potrebno istražiti mehanizme kojima, kod riba dolazi do produkcije zvukova.

## 5. ZAKLJUČAK

1. Rezultati provedenog istraživanja potvrđuju kako su inter-i intra- spolne agresivne interakcije, kao i mužjakovo udvaranje potencijalnoj ženki, popraćeni produkcijom zvukova. Provedeno istraživanje po prvi put opisuje produkciju zvukova ponto-kaspijskog riječnog glavočića, tijekom koje dolazi do emisije kratkih (oko 200 ms) zvukova niskih frekvencija (između 70–80 Hz). S obzirom na navedena svojstva, zvukove možemo klasificirati tonalnim, sa stereotipnom strukturom. Stopa ponavljanja pulseva pokazala se kao najvažnije akustično svojstvo, koje doprinosi razlikovanju i grupiranju vrsta.
2. Rezultati provedenog istraživanja potvrdili su filogenetsku srodnost riječnog glavočića s mediteranskim vrstama iz *Gobius* grupe (*Padogobius* kompleks i glavoč mrkuljem). Navedene vrste, s obzirom na akustična svojstva, grupirane su zajedno tijekom analize, prvenstveno zato što produciraju tonalne zvukove visokih vrijednosti stope ponavljanja pulseva te kratkog trajanja zvuka, čime smo potvrdili rezultate prijašnjih molekularnih istraživanja, koje također grupiraju navedene vrste. Također, pokazalo se kako tonalni zvukovi riječnog glavočića, po svojim akustičnim svojstvima, izrazito nalikuju zvukovima talijanskog glavočića, s kojim dijeli niz morfoloških sličnosti.
3. Objasnili smo geološke prilike koje su vladale tijekom Miocena, za vrijeme kojih je došlo do postepenog isušivanja i ispunjavanja Mediteranskog bazena morskom vodom. Navedene prilike pružile su mogućnost nekadašnjim populacijama za rapidno širenje i brzu evoluciju. Također, objasnili smo današnju brojnost i distribuciju glavoča u Europi.
4. Buduća molekularna istraživanja ponto-kaspijskih vrsta zasigurno će objasniti njihovu filogenetsku srodnost s ostalim glavočima, ali kako naše istraživanje potvrđuje, akustična svojstva zasigurno bi mogla znatno doprinjeti tim istraživanjima, pošto se rezultati akustičnih i molekularnih analiza poklapaju. Stoga, smatramo kako bi se akustična svojstva trebali češće koristiti prilikom rekonstrukcije filogenetskih odnosa određenih skupina životinja.

## 6. LITERATURA

- Agorreta A., San Mauro D., Schlieven U., Van Tassell J. L., Kovačić M., Zardoya R., Rüber L. (2013): Molecular phylogenetics of Gobioidae and phylogenetic placement of European gobies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **69**: 619–633.
- Amorim M. C. P., Neves A. S. M. (2007): Acoustic signalling during courtship in the painted goby, *Pomatoschistus pictus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **87**: 1017–1023.
- Barber S. B., Mowbray W. H. (1956): Mechanism of sound production in the sculpin. *Science* **124**: 219–220.
- Bass A. H., McKibben J. R. (2003): Neural mechanisms and behaviors for acoustic communication in teleost fish. *Progress in Neurobiology* **69**: 1–26.
- Bradbury J. W., Vehrencamp S. L. (1998): Principles of animal communication. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Butlin R. (1987): Speciation by reinforcement. *Trends Ecology Evolution* **2**: 8–13.
- Butlin R. (1989): Reinforcement of premating isolation. U: Otte D, Endler J. A., (ur.), Speciation and its consequences. Sunderland, MA: Sinauer Associates, str. 158–179.
- Bucković D. (2006): Historijska geologija 2, Mezozoik I Kenozoik. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu-Manualia universitatis studiorum Zagabiensis, str. 96–96.
- Cap H., Deleporte P., Joachim J., Reby D. (2008): Male vocal behavior and phylogeny in deer. *Cladistics* **24**: 917–931.
- Carpenter J. M. (1999): Testing scenarios, wasp social behavior. *Cladistics* **5**: 131–144.
- Cocroft R. B., Ryan M. J. (1995): Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behaviour* **49**: 283–303.
- Connaughton M. A. (2004): Sound generation in the searobin (*Prionotus carolinus*), a fish with alternate sonic muscle contraction. *Journal of Experimental Biology* **207**: 1643–1654.
- Conner W. E. (1999): ‘Un chant d’appel amoureux’: acoustic communication in moths. *Journal of Experimental Biology* **202**: 1711–1723.
- Coyne J. A., Orr H. A. (1989): Pattern of speciation in *Drosophila*. *Evolution* **43**: 362–381.
- Coyne J. A., Orr H. A. (1997): Pattern of speciation in *Drosophila* revisited. *Evolution* **51**: 295–303.

- Crespi B. J., Carmean D. A., Mound L. A., Worobey M., Morris D. (1998): Phylogenetics of social behavior in Australian gall-forming thrips: evidence from mitochondrial DNA sequence, adult morphology and behavior, and gall morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **9**: 163–180.
- Delić A., Šanda R., Bučar M., Mihoci I., Vilenica M., Vukić J., Lelo S., Kučinić M. (2014): Distribution of the monkey goby, *Neogobius fluviatilis* (Pallas, 1814) in Bosnia and Herzegovina and Croatia with notes on ecology and associated fish fauna. *Natura Croatica* **23**: 297–302.
- Desutter-Grandcolas L. (1997): A phylogenetic analysis of the evolution of the stridulatory apparatus in the true crickets (Orthoptera, Grylloidea). *Cladistics* **13**: 101–108.
- Dobzhansky T. (1951): *Genetics and the origins of species*, 3<sup>rd</sup> edition. New York, Columbia University Press.
- Fine M., Friel J., McElroy D., King C., Loesser K., Newton S. (1997): Pectoral spine locking and sound production in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Copeia*, **1997**: 777-790.
- Fine M. L., Winn H. E., Olla B. (1977b): Communication in fishes. U T. Sebok. *How animals communicate*. Indiana University Press, Bloomington, str. 472-518.
- Fine M. L., Malloy K. L., King C. B., Mitchell S. L., Cameron T. M. (2001): Movement and sound generation by the toadfish swimbladder. *Journal of Comparative Physiology A* **187**: 371-379.
- Fish M. P., Kelsey, Jr. A. S., Mowbray W. H. (1952): Studies on the production of underwater sound by North Atlantic coastal fishes. *Journal of Marine Research* **11**: 180-193.
- Fish M. P., Mowbray W. H. (1970): *Sounds of western North Atlantic fishes*. Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland.
- Gingras B., Mohandesan E., Boko D., Fitch W. T. (2013): Phylogenetic signal in the acoustic parameters of the advertisement calls of four clades of anurans. *BMC Evolutionary Biology*. **13**: 134-135.
- Gracey A. (2008): The *Gillichthys mirabilis* Cooper array: a platform to investigate the molecular basis of phenotypic plasticity. *Journal of Fish Biology* **72**: 2118–2132.
- Hawkins A. D. (1986): Underwater sound and fish behaviour. U: Pitcher T.J. (ur.). *The behaviour of teleost fishes*. Groom Hellm, London, str. 114-151.
- Hoese D. F. (1984): Gobioidae relationships. U: Moser H. G., Richards W. J., Cohen D. M., Fahay M. P., Kendall Jr. A. W., Richardson S. L. (ur.) *Ontogeny and systematics of fishes*. Am. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Pub. No. 1, str. 588–591.
- Huyse T., Van Houdt J., Volckaert F. A. M. (2004): Paleoclimatic history and vicariant speciation in the “sand goby” group (Gobiidae, Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**: 324–336.
- Johnson G. D., Patterson C. (1993): Percomorph phylogeny: a survey of acanthomorphs and a new proposal. *Bulletin of Marine Science*. **52**: 554–626.

- Kastberger G. (1981): Economy of sound production in piranhas (Serrasalminae, Characidae): I. Functional properties of sonic muscles. *Zoologische Jahrbucher Abteilung fuer Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere* **85**: 113- 125.
- Kasumyan A. O. (2008): Sounds and sound production in fishes. *Journal of Ichthyology* **48**: 981–1030.
- Kratochvil H. (1985): Beiträge zur Lautbiologie der Anabantoidei-Bau, Funktion und Entwicklung von lauterzeugenden Systeme. *Zoologische Jahrbucher Abteilung fuer Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere* **89**: 203-255.
- Kottelat M., Freyhof J. (2007): Handbook of European freshwater fishes. Kottelat, Comol, Switzerland and Freyhof. Berlin, Germany.
- Ladich F., Kratochvil H. (1989): Sound production in the Marmoreal goby *Proterorhinus marmoratus* (Pallas) (Gobiidae, Teleostei). *Zoologische Jahrbucher Abteilung fuer Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere*. **93**: 501–504.
- Lugli M., Pavan G., Torricelli P., Bobbio L. (1995): Spawning vocalizations in male freshwater gobiids (Pisces, Gobiidae). *Environmental Biology of Fishes*. **43**: 219-231.
- Lugli M., Torricelli P., Pavan G., Mainardi D. (1997): Sound production during courtship and spawning among freshwater gobiids (Pisces, Gobiidae). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* **29**: 109-126.
- Lugli M., Torricelli P. (1999): Prespawning sound production in Mediterranean sand-gobies. *Journal of Fish Biology* **54**: 691-694.
- Nakatsuji T., Kitano T., Akiyama N., Nakatsuji N. (1997): Ice goby (shiro-uo), *Leucopsarion petersii*, may be a useful material for studying teleostean embryogenesis. *Zoological Science* **14**: 443–448.
- Nelson, J. S. (1994): *Fishes of the world*. John Wiley and Sons, Inc. New York. 3d edition
- Nelson, J.S. (2006): *Fishes of the World*. 4th edition. John Wiley & Sons, str. 108-362.
- Neilson M.E., Stepien C.A. (2009): Escape from the Ponto-Caspian: Evolution and biogeography of an endemic goby species flock (Benthophilinae: Gobiidae: Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **52**: 84–102.
- Maitland P.S. (2000): *Guide to Freshwater Fish of Britain and Europe*. Hamlyn, London.
- Malavasi S., Torricelli P., Lugli M., Pravoni F., Mainardi D. (2003): Male courtship sounds in a teleost with alternative reproductive tactics, the grass goby, *Zosterisessor ophiocephalus*. *Environmental Biology of Fishes* **66**: 231-236.
- Malavasi S., Collatuzzo S., Torricelli P. (2008): Interspecific variation of acoustic signals in Mediterranean gobies (Perciformes, Gobiidae): Comparative analysis and evolutionary outlook. *Biological Journal of the Linnean Society* **93**: 763–778.



- Malavasi S., Gkenas C., Leonardos I., Torricelli P., McLennan D. (2012): The phylogeny of a reduced 'sand goby' group based on behavioural and life history characters. *Zoological Journal of the Linnean Society*. **165**: 916–924.
- McCracken K. G., Sheldon F. H. (1997): Avian vocalizations and phylogenetic signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 3833–3836.
- McLennan D. A., Brooks D. R., McPhail J. D. (1988): The benefits of communication between comparative ethology and phylogenetic systematics: a case study using gasteroid fishes. *Canadian Journal of Zoology* **66**: 2177–2190.
- McLennan D. A. (1994): A phylogenetic approach to the evolution of fish behaviour. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **4**: 430–460.
- Medvedev D. A., Sorokin P. A., Vasil'ev V. P., Chernova N. V., Vasil'eva E. D. (2013): Reconstruction of Phylogenetic Relations of Ponto-Caspian Gobies (Gobiidae, Perciformes) Based on Mitochondrial Genome Variation and Some Problems of Their Taxonomy. *Journal Of Ichthyology* **53**: 702–712.
- Miller P. J. (1986): Gobiidae. U: Whitehead P. J. P., Bauchot M. L., Hureau J. -C., Nielsen J., Tortonese E. (ur.), *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*. UNESCO, Paris, 3 vol, str. 1984–1986.
- Miller, P. J. (1990): The endurance of endemism—the Mediterranean fresh-water gobies and their prospects for survival. *Journal of Fish Biology*. **37**: 145–156.
- Miller P.J. (2003): Gobiidae I. U: Miller P. J. (ur.), *The Freshwater Fishes of Europe*. Wissenschaft, Germany: Aula-Verlag, str. 157–224.
- Miller P J. (2004.): Gobiidae I. U: Miller P. J. (ur.), *The Freshwater Fishes of Europe*. Wissenschaft, Germany: Aula-Verlag.
- Millot S., Vandewalle P., Parmentier E. (2011): Sound production in red-bellied piranhas (*Pygocentrus nattereri*, Kner): an acoustical, behavioural and morphofunctional study. *Journal of Experimental Biology* **214**: 3613–3618.
- Myrberg A. A., Lugli M. (2006): Reproductive behavior and acoustical interations. U: Ladich F., Collin S. P., Moller P., Kaapor B.G. (ur.), *Communication in fishes*, Vol. 1. Enfield, NH: Science Publishers, 146–176.
- Oates J.F., Trocco T.F. (1983): Taxonomy and phylogeny of black and white colobus monkeys. Inferences from analysis of loud call variation. *Folia Primatologica* **40**: 83–113.
- Parmentier E., Colleye O., Fine M. L., Frédérick B., Vandewalle P., Herrel A. (2007): Sound production in the clownfish *Amphiprion clarkii*. *Science* **316**: 1006.

- Parmentier E., Lecchini D., Frederich B., Christophe B., Mann D. (2009): Sound production in four damselfish (*Dascyllus*) species: phyletic relationships? *Biological Journal of the Linnean Society*, **97**: 928–940.
- Parmentier E., Fabri G., Kaatz I., Decloux N., Planes S., Vandewalle P. (2010a): Functional study of the pectoral spine stridulation mechanism in different mochokid catfishes. *Journal of Experimental Biology* **213**: 1107–1114.
- Parmentier E., Vandewalle P., Brié C., Dinraths L., Lecchini D. (2011a): Comparative study on sound production in different Holocentridae species. *Frontier in Zoology* **8**: 12.
- Parmentier E., Kéver L., Boyle K., Corbisier Y., Sawelew L., Malavasi S. (2013): Sound production mechanism in *Gobius paganellus* (Gobiidae). *The Journal of Experimental Biology* **216**: 3189–3199.
- Patzner R. A., Van Tassell J. L., Kovačić M., Kapoor B. G. (2011): *The Biology of Gobies*. Science Publishers, Enfield, NH.
- Penzo E., Gandolfi G., Bargelloni L., Colombo L., Patarnello T. (1998): Messinian salinity crisis and the origin of freshwater lifestyle in western Mediterranean Gobies. *Molecular Biology and Evolution* **15**: 1472–1480.
- Polgar G., Malavasi S., Cipolato G., Georgalas V., Clack J. A., Torricelli P. (2011): Acoustic communication at the water's edge: Evolutionary insights from a mudskipper. *PLoS ONE* **6**: e21434.
- Pough H. F., Janis C., Heiser J. B. (2005): *Vertebrate Life*, 7th Edition. Prentice Hall.
- Proctor H. C. (1992): Sensory exploitation and the evolution of male mating behavior: a cladistic test using water mites (Acari: Parasitengona). *Animal Behavior* **44**: 745–752.
- Queiroz D. K., Wimberger P. H. (1993): The usefulness of behavior for phylogeny estimation: levels of homoplasy in behavioral and morphological characters. *Evolution* **47**: 46–60.
- Rice A. N., Bass A. H. (2009): Novel vocal repertoire and paired swimbladders of the three-spined toadfish, *Batrachomoeus trispinosus*: insights into the diversity of the Batrachoididae. *Journal of Experimental Biology* **212**: 1377–1391.
- Robillard T., Legendre F., Desutter-Grandcolas L., Grandcolas P. (2006): Phylogenetic analysis and alignment of behavioral sequences by direct optimization. *Cladistics* **22**: 602–633.
- Rollo A., Andraso G., Janssen J., Higgs D. (2007): Attraction and localization of round goby (*Neogobius melanostomus*) to conspecific calls. *Behaviour* **144**: 1–21.
- Rountree R. A., Goudey C., Hawkins T., Luczkovich J. D., Mann D. (2003a): *Listening to fish: passive acoustic applications in marine fisheries*. Sea Grant Digital Oceans. Massachusetts Institute of Technology Sea Grant College Program.

- Rountree R. A., Goudey C., Hawkins T. (2003b): Listening to fish: proceedings of the international workshop on the applications of passive acoustics to fisheries. 8-10 April 2002. Dedham, MA. MIT Sea Grant Technical Report MITSG 03-2.
- Rüber L., Agorreta A. (2011): Molecular systematics of gobioid fishes. U: Patzner R. A., Van Tassell J. L., Kovačić M., Kapoor B.G. (ur.) The Biology of Gobies. Science Publishers, Enfield, NH, str. 23–50.
- Sanzo L. (1911): Distribuzione della papille cutanee (organi ciatiformi) e suo valore sistematico nei gobi. Mitteilungen aus der Zoologischen Atation zu Neapel **20**: 249-328.
- Sayer M. (2005): Adaptations of amphibious fish for surviving life out of water. Fish Fish. **6**: 186–211.
- Sebastianutto L., Picciulin M., Costantini M., Rocca M., Ferrero E. (2008): Four types of sounds from one winner: Vocalizations during territorial behaviour in the red-mouthed goby *Gobius cruentatus* (Pisces, Gobiidae). Acta Ethologica **11**: 115-121.
- Simonovic P. D., Nikolić V. P., Skora K. E. (1996): Vertebral number in Ponto-Caspian gobies: phylogenetic relevance- Journal of Fish Biology. **49**: 1027-1029.
- Springer V. G., Johnson G. D. (2004): Study of the dorsal gill-arch musculature of teleostome fishes, with special reference to the Actinopterygii. Bulletin of the Biological Society of Washington. **11**: 214-130.
- Tavares E. S., Baker A. T., Pereira S. L., Miyaki C. Y. (2006): Phylogenetic relationships and historical biogeography of neotropical parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. Systematic Biology **55**: 454– 470.
- Tavolga W. N. (1971): Sound production and detection. U: Hoar W. S., Randall D. J. (ur.), Fish Physiology, vol. 5 New York, NY: Academic Press, str. 135-206.
- Thacker C. E. (2003): Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidei) Molecular Phylogenetics and Evolution **26**: 354–368.
- Thacker C. E. (2009): Phylogeny of Gobioidei and Placement within Acanthomorpha, with a New Classification and Investigation of Diversification and Character Evolution. Copeia **1**: 93–104.
- Thacker C. E., Roje D. M. (2011): Phylogeny of Gobiidae and identification of gobiid lineages. Systematics and Biodiversity **9**: 329-347.
- Tinbergen N. (1959): Comparative studies of the behaviour of gulls. Behaviour **15**: 1–70.
- Torricelli P., Lugli M., Pavan G. (1990): Analysis of sound produced by male *Padogobius martensi* (Pisces: Gobiidae) and factors affecting their structural properties. Bioacoustics **2**: 261-275.
- Vanhove M. P. M., Economou A.N., Zogaris S., Larmuseau M. H. D., Giakoumi S., Kalogianni E., Volckaert F. A. M., Huyse T. (2012): Phylogenetics and biogeography of the Balkan ‘sand gobies’ (Teleostei: Gobiidae): vulnerable species in need of taxonomic revision. Biological Journal of the Linnean Society **105**: 73–91.

Whitehead P. J. P., Bauchot M. L., Hureau J. -C., Nielsen J., Tortonese E. (1984-1986): Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean. UNESCO, Paris, 3 vol

Wenzel J. (1992): Behavioral homology and phylogeny. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics **23**: 361–381.

Internetski izvori:

[http://www.hlasek.com/neogobius\\_fluviatilis1en.html](http://www.hlasek.com/neogobius_fluviatilis1en.html), pristupljeno pristupljeno 10. srpnja 2015.

<http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=14521>, pristupljeno 10. srpnja 2015.